EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
OCT 22 '56

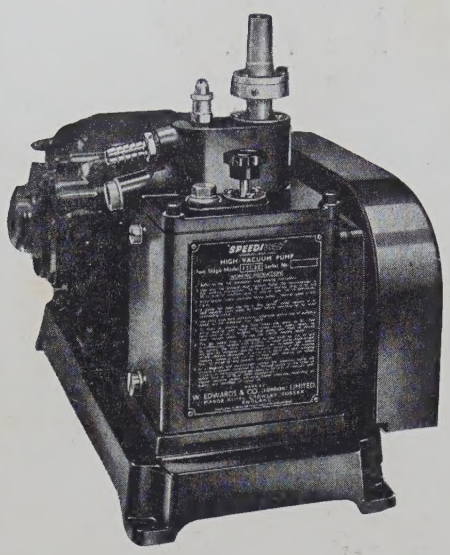
SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

I. E. Bush: The 11-Oxygen Function in Steroid Metabolism 325
O. Loewi: On the Intraneural State of Acetylcholine 331

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

S. Deutsch et E. Picciotto: Présence d'uraninite dans les minéraux accessoires du granite de baveno 333
C. A. Grob und F. Gadient: Synthese der *cis*-erythro- und *cis*-threo-Formen des Sphingosins 334
D. T. Haworth, E. F. Neuzil, and S. L. Kittsley: Thermodynamics of the *cis-trans* Interconversion of Dichloro-bis-(ethylenediamine)-cobalt (III) Chloride 335
R. N. Chakravarti and B. Dasgupta: Sterol from *Aegle marmelos* 335
V. G. Dethier and M. L. Wolbarsht: The Electron Microscopy of Chemosensory Hairs 335
R. Matthey: Cytologie comparée des Muridae. L'origine des Elobii 337
Mary S. Wheatley: Recombination Rates of Substituted Phenylglyoxylate Ions with Hydronium and Deuteronium Ions 339
G. N. Ramachandran and M. S. Santhanam: *In Vitro* Calcification of Collagen 340
H. und E. Hofmann: Wirkung von δ-Tubocurarinchlorid auf den O_2-Verbrauch der Eier von *Psammechinus microtuberculatus* 341
Joanne L. Gellerman and Hermann Schlenk: Quantitative Paper Chromatography of Lipids 342
W. Florsheim, B. Dimick, and M. E. Morton: The Influence of Albumin on the Electrophoretic Mobility of Serum Lipids 343
C. Jacot et H. Staub: Hypertension expérimentale et protéines sériques 344
J. C. F. Schubert: Differenzierungsmethode metachromatischer Zellen nach ihrem Säuregrad 346
S. Garattini, C. Morpurgo, and N. Passerini: Diphenylilethylacetic Acid Inhibits Hypercholesteremia Induced by Triton 347
I. Raw: Isolation of a Cytochrome of the Antimycin A. Sensitive Pathway for DPNH Oxidation 348
John S. Cook: Effects of Ultraviolet Light on some of the Electrical Characteristics of Action Potentials of Single Unmyelinated Nerve Fibers of the Crab *Carcinus* 349
F. N. Fastier: Prolongation of Hypnosis by 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) 351
H. Mooser: Selektive insektizide Wirkung des Butazolidins 352
Jack S. Dunlap, Verner L. Johnson, and Donald S. Farner: Multiple Hemoglobins in Birds 352
R. Chauvin et Janine Pain: Le développement des ovaires des ouvrières des abeilles et l'ectohormone des reines (Disputanda) 354
Y. Bounameaux: Recherches sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorphose visqueuse des plaquettes 355
E. Hochuli, O. Kaeser und M. Burger: Adrenalin- und Noradrenalinbestimmungen im Blutplasma unter der Geburt 356
F. Binon et G. Deltour: Action pancréatotrope de la carnitine 357
E. de Gruyter: Millivoltmeter (Pro Laboratorio) 357
A. Stoll, R. Morf, A. Rheiner und J. Renz: Über Inhaltsstoffe aus *Petasites officinalis* Moench. I. Petasin und die Petasitolester B und C. 360
H. Elias: Vierdimensionale Geometrie und ihre praktische Anwendung zur Erklärung kosmologischer Probleme (Theoria) 362

EDWARDS GASBALLAST-PUMPEN



Ein- od. zweistufig
Kleinste bis
grösste Leistung
Geräuscharm
Robust

**Verlangen
Sie unsere
Unterlagen**

LIEFERPROGRAMM

Hochvakuumgeräte · Vakuumpumpen · Kolorimeter · Spektrophotometer · Spektrographen
Spektralreine Substanzen
Heizgeräte für Labor · Hochdruckgeräte · Laborzentrifugen
Histologie-Präpariergeräte
Mikrotome und Ultramikrotome. Oel-Fett-Prüfgeräte

VERTRETUNGEN

Johnson, Matthey & Co. Ltd. London
Hilger & Watts Ltd. London
Jarrell Ash & Co. Newtonville U.S.A.
W. Edwards & Co. Ltd. London
Electrothermal Engineering Ltd. London
MSE Ltd. London
t'Hart & Zn. Rotterdam
Stanhope Eng. Co. Ltd. London

N. ZIVY & CIE S.A.

Basel, Spalenring 164, Tel. (061) 229786

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XII/9

Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba A. G., Basel
Ganz & Co., Zürich
Kern & Co., Aarau
Sandoz A. G., Basel
Trüb, Täuber, Zürich
Wild Heerbrugg AG., Heerbrugg
N. Zivy & Cie. S. A., Basel

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 36 francs pour la Suisse; pour l'étranger 46 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero sfr. 46.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 36.–; other countries sfr. 46.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1956 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15, Telephon (061) 24 98 00; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

IM HERBST 1956 ERSCHEINT

Fünfzig Jahre Relativitätstheorie
Cinquantenaire de la Théorie de la Relativité
Jubilee of Theory of Relativity
Bern, 11.–18. Juli 1955

herausgegeben von / édité par / edited by
A. Mercier und *M. Kervaire*
10 Hauptvorträge und 23 Kurze Mitteilungen mit Diskussionen – 10 Exposés principaux et 23 Communications avec leurs discussions – 10 Main Reports and 23 Short Lectures with Discussions.

Etwa 320 Seiten, Fr./DM 36.–

HELVETICA PHYSICA ACTA, SUPPLEMENTUM IV

Autoren / Auteurs / Authors:

A. D. Alexandrov –
W. F. Baade – P. G. Bergmann – H. Bondi – M. Born
E. Corinaldesi – O. Costa de Beauregard
D. van Dantzig – V. A. Fock – Mme Y. Fourès-Bruhat
J. Géhéniau – Mrs. B. Harris-Kaufman
O. Heckmann – F. Hoyle – L. Infeld – P. Jordan
K. Just – O. Klein – M. von Laue
A. Lichnérowicz – G. Ludwig – W. H. McCrea
C. Møller – A. Papapetrou – W. Pauli
F. A. E. Pirani – H. P. Robertson – N. Rosen
W. Scherrer – J. Tits – Mme A. Tonnelat
R. J. Trumpler – E. Wigner.

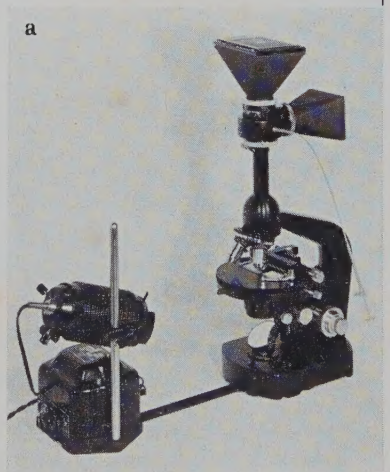
Bestellungen nimmt Ihr Buchhändler entgegen

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL / STUTTGART

Mikrophotographien

besser einfacher rascher

Wild offeriert zwei Ausrüstungen, die bei minimalem Aufwand hervorragende Resultate gewährleisten:



a) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Wild-Aufsatzkamera I, Einstellokular, Rollfilmkassette und leistungsfähiger Niedervolt-Mikroskopierlampe.

b) Forschungs-Mikroskop Wild M 20 mit Phototubus, Wild-Aufsatzkamera II, Kleinbildkassette und Einbaubeleuchtung.

WILD
HEERBRUGG

Prospekt Mi 619 kostenlos durch

Wild Heerbrugg AG.
Heerbrugg / Schweiz

BECKMAN

AUTOMATISCHES
QUARZ-SPEKTROPHOTOMETER

MODELL

DK-2

- Lineare Wellenlänge-Darstellung Ultraviolett bis Nah-Infrarot **185–3500 mμ**
- Wahlweise lineare Aufzeichnung in Transmission und Extinktion
- Differentialmessungen an nahezu gleichen Proben
- Auflösung: 0,3 mμ im UV
  1 mμ im Sichtbaren
  3 mμ im IR
- Doppelstrahlprinzip kombiniert mit den Vorteilen des Einstrahlverfahrens
- Empfänger: Pbs-Zellen modernster Konstruktion. 1P28 Photomultiplier
- Wechselstromnetzanschluß 220 V 50 Hz. Eingebaute hochwirksame Stabilisation

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal!

Bitte verlangen Sie Prospekt Nr. 377/E

GANZ & CO
BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73
Zürich

Mikro-Elektrophorese-apparat Kern, Modell LK 30

Interferometrische Registrierung des Konzentrationsverlaufs, zuverlässige, einfache Arbeitsweise und Auswertung.

Jetzt auch mit Simultanzelle zur gleichzeitigen Durchführung zweier Analysen.

Verlangen Sie Prospekte Med. 558 und Med. 564

Kern & Co. AG. Aarau gegr. 1819

EXPERIENTIA *Sammelmappe*

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, dass einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

BESTELLSCHEIN

An den Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: Vorname:

Ort: Strasse:

Bitte in Blockschrift schreiben

EXPERIENTIA

Vol. XII - Fasc. 9 Pag. 325–364 15. IX. 1956

The 11-Oxygen Function in Steroid Metabolism*

By I. E. BUSH[1]

It seems appropriate at the present time to discuss the 11-oxygen function in steroid metabolism, a field to which VERZÁR[2] has given stimulating contributions. Much work has accumulated in the last 5 years which has not been reviewed specifically from this point of view. Indeed, it seems striking that this aspect of steroid biochemistry has received so little attention after the first flush of excitement over the therapeutic effects of cortisone was over. This is not to say that the problem has not been the subject of many and interesting pieces of work; it appears merely that such work has not yet been discussed fully from this point of view, and that certain clear lines emerging from these experimental results are in danger of being neglected and lost to view in the mass of work that has been done. In this paper, therefore, an attempt will be made to emphasize these lines, necessarily at the expense of others, with a view to framing some working hypotheses embracing present work. This attempt will involve, necessarily, some speculation, which should be recognized as such, and no attempt will be made to provide a complete review of this field which is already covered admirably by the reviews of LIEBERMAN and TEICH[3], ROBERTS and SZEGO[4], HECHTER and PINCUS[5], and SZEGO and ROBERTS[6].

Physico-chemical factors at C-11

There have been few additions to our knowledge of these factors in recent years, and, although these few contributions are extremely interesting, it is disappointing that more intensive work has not been done. However, a major recent advance is the synthesis and biological testing of the 9α-halogenated 11-hydroxy steroids, which for the first time emphasizes the importance of electronic shifts, at (or near) the 11-oxygen function, in determining its pharmacological properties.

The stereochemical properties of C-11 have long received close attention because of the chemical difficulties of introducing groups at this position. Both the oxo and β-hydroxyl groups are extremely unreactive at this position, while the 11α-hydroxyl group (equatorial configuration) is normally reactive. These findings are readily explained on purely stereochemical grounds (FIESER and FIESER[7]), and it is usual to presume that electronic factors are of little importance compared with the pronounced steric hindrance at this position. The steric factors are in fact rather critical, as shown by the fact that even such small molecules as hydrazine and hydroxylamine will not condense with the 11-oxo group, and the 11β-hydroxyl group is not esterified with acetylating agents unless powerful catalysts are used (OLIVETO *et al.*[8]). These authors also found that the 11β-acetoxy group is not hydrolyzed by refluxing methanolic sodium hydroxide, a remarkable degree of stability for esters of this type.

Further information suggesting the considerable degree of steric hindrance at C-11 comes from studies of the direction of reduction of the 11-oxo group (BERNSTEIN *et al.*[9]). Thus, reduction with metal hydrides, in which the attacking reagent is the relatively large metal hydride ion, gives almost exclusively the 11β-hydroxyl epimer (axial), while reduction with reagents attacking by means of electron transfer and proton attack affords more than 90% yields of the 11α-hydroxyl epimer (equatorial and thermodynamically more stable).

The importance of electronic factors in the properties of the 11-oxygen function has long been suspected but difficult to define or investigate. Thus, 11-oxo-17-oxosteroids show a greatly increased rate of reaction, and an altered colour, with alkaline *m*-dinitrobenzene compared with the 11-deoxy analogues, while 11β-hydroxy-17-oxosteroids show opposite changes. It is difficult to explain these effects on stereochemical grounds since this reaction involves the active methylene group at C-16. Other examples of obvious elec-

* Dedicated to Professor F. VERZÁR, for his 70th birthday on September 18, 1956.

[1] Medical Unit, St. Mary's Hospital, London, W. 2, England.

[2] F. VERZÁR and F. C. WANG, Amer. J. Physiol. *159*, 263 (1949). – F. VERZÁR, *The suprarenal cortex* (Ed. Yoffey, Butterworths, London 1952), p. 39.

[3] S. LIEBERMAN and S. TEICH, Pharmacol. Rev. *5*, 285 (1953).

[4] S. ROBERTS and C. M. SZEGO, Physiol. Rev. *33*, 593 (1953).

[5] O. M. HECHTER and G. PINCUS, Physiol. Rev. *34*, 459 (1954).

[6] C. M. SZEGO and S. ROBERTS, Ann. Rev. Biochem. *24*, 543 (1955).

[7] L. F. FIESER and M. FIESER, *Natural products related to phenanthrene* (Reinhold, New York 1949).

[8] E. P. OLIVETO, C. GEROLD, and E. HERSHBERG, Arch. Biochem. Biophys. *43*, 234 (1953).

[9] S. BERNSTEIN, L. H. LENHARD, and J. H. WILLIAMS, J. org. Chem. *18*, 1166 (1953).

tronic effets of C-11 oxygen functions include, for instance, the regular (and opposed) shifts in absorption maximum of the Δ^4-3-oxosteroids of both C_{21} and C_{19} series produced by the introduction of an 11-oxo or 11-hydroxyl group (Antonucci *et al.*[10]). These effects are remarkable in being apparently transmitted over many C–C bonds in an alicyclic system.

Still more striking from this point of view are the results of Fried and Sabo[11] and Goldfien *et al.*[12] on the biological activity of the 9α-halogenated hydrocortisones. These workers have shown that the order of activities, in bioassays for glucocorticoids and in man, is: F > Cl > Br > H ⩾ I (using hydrocortisone derivatives). This striking correlation with the electronegativity series, with the exception of the large iodine atom which is often abnormal in such series of compounds, suggests that in the biological activity of the 11-oxygenated adrenocortical steroids electronic shifts are at least as important as steric factors in determining the required physico-chemical properties. Other possible interpretations exist and will be discussed later.

The influence of 11-oxygen functions on metabolic pathways

With a few exceptions, the overall direction of steroid metabolism in man and other species is reductive. The reduced products, as with many other substances, are finally conjugated with sulphuric or glucuronic acid and excreted as the relatively soluble and rapidly cleared conjugates (Dorfman and Ungar[13]; Lieberman and Teich[3]). While the introduction of 11-oxygen functions seems to have little influence on the direction of reductions at C-20* and C-17, there is a pronounced effect on reduction at C-3, which has been studied and emphasized by Dorfman's group (Dorfman[14]) and by the Sloan-Kettering group (Fukushima *et al.*[15]: Gallagher[16]).

The reduction at C-3 involves usually the reduction of an αβ-unsaturated ketone group so that both the orientation of the resulting hydroxyl group and of the *A*/*B* ring junction after saturation are involved. The main findings are that 17-hydroxyl-C_{21} steroids give rise almost exclusively to 3α-hydroxy-(5β) steroids whether of C_{21} or C_{19} series, while 11-deoxy-C_{19} steroids give rise to roughly equal parts of (5α) and (5β) metabolites, as do 17-deoxy-C_{21} steroids (Engel *et al.*[17]; Fukushima *et al.*[18]). On the other hand, the 11-oxo-17-oxo steroids (C_{19}) give rise to about four parts of (5α) and one of (5β) metabolites. When this is combined with the fact that the 11-oxygen function is not known to be introduced normally by any tissue other than the adrenal cortex, or to be removed by any tissue of the body, it follows that estimation of the proportion of (5α) and (5β) epimers among the 11-oxygenated C_{19} steroids of urine should enable one to calculate the proportions of hydrocortisone and 11β-hydroxyandrost-4-en-3,17-dione being secreted by the adrenal cortex. It also suggests that reduction of the 17-hydroxy-C_{21} hormones at C-3 and C-4,5 occurs prior to removal of the sidechain in the formation of their 17-oxosteroid metabolites (Dorfman[19]).

Dorfman's original presentation was based on rather few cases and was criticized by Gallagher[20]. Although subsequent work appears to show that the (5α)/(5β) ratio of metabolites from any one precursor varies fairly considerably both in different subjects, and in the same subject at different times following administration (Dorfman[21]) most workers have confirmed the general features of Dorfman's theory which remains one of the most stimulating contributions to steroid metabolism in recent years. Results obtained in the author's laboratory over the last three years have mostly confirmed predictions from this theory, although experience with the type of equations used by Dorfman[19] has shown that, because of the far higher yield of 11-oxygenated 17-oxosteroids from adrenosterone than from cortisone and hydrocortisone, the calculated adrenal secretion rate of the two types of hormone is subject to enormous error. In one experiment (Bush *et al.*[22]) good agreement was obtained between the observed adrenal secretion rate of a patient undergoing adrenalectomy, and the urinary metabolites over the same period, but very slight changes in the constants assumed for the percentage conversion of hydrocortisone and 11-hydroxyandrost-4-en-3,17-dione to 17-oxosteroids, would have completely destroyed this agreement. Again the ratio of products from

[10] R. Antonucci, S. Bernstein, M. D. Heller, R. H. Lenhard, R. Littel, and J. H. Williams, J. org. Chem. *18*, 70 (1953).

[11] J. Fried and E. F. Sabo, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1455 (1954).

[12] A. Goldfien, J. C. Laidlaw, N. A. Haydar, A. A. Renold, and G. W. Thorn, New Engl. J. Med. *252*, 415 (1955).

[13] R. I. Dorfman and F. Ungar, *Metabolism of steroid hormones* (Burgess, Minneapolis 1953).

* *Added in proof:* H. J. Hubener, D. K. Fukushima, and T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *220*, 499 (1956) show a striking difference in the effect of 11-oxo and 11β-hydroxyl groups on reduction at C-20.

[14] R. I. Dorfman, Recent Progr. Hormone Res. *9*, 5 (1954); in: 5th Conference on the Adrenal Cortex (Josiah Macy Jr. Foundation, New York 1954); Ann. N. Y. Acad. Sci. *61*, 291 (1955).

[15] D. K. Fukushima, H. L. Bradlow, K. Dobriner and T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *206*, 863 (1954). – D. K. Fukushima, K. Dobriner, and T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *206*, 845 (1954).

[16] T. F. Gallagher, Recent Progr. Hormone Res. *9*, 26 (1954); in: 5th Conference on the Adrenal Cortex (Josiah Macy Jr. Foundation, New York 1954).

[17] L. L. Engel, P. Carter, and M. J. Springer, Fed. Proc. *13*, 204 (1954).

[18] D. K. Fukushima, H. L. Bradlow, K. Dobriner, and T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *206*, 863 (1954). – D. K. Fukushima, K. Dobriner, and T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *206*, 845 (1954). – D. K. Fukushima, A. D. Kemp, R. Schneider, H. B. Stokem, and T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *210*, 129 (1954).

[19] R. I. Dorfman, Recent Progr. Hormone Res. *9*, 5 (1954).

[20] T. F. Gallagher, Recent Progr. Hormone Res. *9*, 26 (1954).

[21] R. I. Dorfman, Ann. N. Y. Acad. Sci. *61*, 291 (1955).

[22] I. E. Bush, J. Swale, and J. Patterson Biochem. J. *62*, 16P (1956).

the administration of adrenosterone to a healthy young male agreed well with Dorfman's figures, while a similar experiment on a man of 58, who had undergone bilateral orchidectomy and adrenalectomy for carcinoma of the prostate, resulted in a complete inversion of the expected ratio.

Further modification of Dorfman's theory may be necessary to account for our recent finding[23] that the (5α) epimer of tetrahydrohydrocortisone[24] (5α-pregnan-3α,11β,17α,21-tetrol-20-one) is a normal and fairly plentiful metabolite of cortisone and hydrocortisone in human urine. The ratio of this steroid to the related (5β) tetrahydro derivatives is larger than suggested by Burstein *et al.*[25] who were unable to find any of this (5α) metabolite after cortisone or hydrocortisone administration.

Similar effects on the steric course taken by reductions at C-3 and C-4,5 are seen in the catalytic reduction of 11-oxygenated and 11-deoxy steroids (Ahrenstein[26]) but the situation now seems without analogy with metabolic reductions, since two separate enzymes are probably responsible, one giving specifically (5α)-reductions, the other specifically (5β)-reductions (Taylor[27]; Forchielli *et al.*[28]). In perfused adrenals the 11β-hydroxyl group seems to prevent other hydroxylations taking place at C-17 and C-21 (Hechter and Pincus[5]). However, it does not prevent hydroxylation at C-2 and C-6 by liver or the whole organism (e.g. Burstein *et al.*[29]).

It is impossible at present to explain the apparently directive effect of the 11-oxygen function in the C_{19} steroid reductions, but it seems clear that neither 11-oxo nor 11β-hydroxyl groups by themselves can affect the affinity for the two reducing enzymes concerned, since they are too strongly hindered. Nor can a simple increase in solubility (affinity for the medium) be the explanation, since many steroids of far greater solubility due to polar groups elsewhere still undergo (5β) reduction preferentially. Similarly, different intracellular sites for the two enzymes (although quite a possibility in view of their widely different sedimentation rates from homogenates [Forchielli *et al.*[28]]) would not explain the effect unless a specific carrier reacting with 11-oxygen functions were responsible. It is however possible that hydrogen bonding with a small molecule at C-11, or even simple hydration, would produce a considerable deformation of the β-side of the molecule which would interfere with (5β) reduction if this involves proton attack from the surface of the enzyme responsible. No such interference with (5α) reduction would occur if the same mechanism was involved, and the (5α) epimer would be favoured. The absence of such an effect in the C_{21} series could then be due to the fact that the long and flexible 17β-sidechain (Sorkin and Reichstein[30]) of the natural steroids is available for association with the enzyme by the β-surface of the steroid. Since such association will be due to semipolar interactions, the forces involved will also be less affected by deformations of the rest of the molecule than the van der Waal's forces, which will play a larger role in the attraction of the C_{19} steroid *D*-ring to an enzyme site. It remains for experiment to discover whether indeed the separate reducing enzymes concerned have specificities in accord with these considerations.

Interconversion of 11-oxo and 11-hydroxyl groups

Ever since Schneider[31] isolated cortisone and tetrahydrocortisone from human urine, it has been apparent that there is a striking contrast between the form of 11-oxygenated steroids in the circulating blood and in urine. In the former, 11β-alcohols are found in far larger quantities than the related 11-ketones, while the 11-ketones predominate in urine in most cases (Hechter and Pincus[5]; Lieberman and Teich[3]). The very general application of this rule has been confirmed with every succeeding paper (e. g. Burton *et al.*[32]; de Courcy *et al.*[33]; Richardson *et al.*[34]), but the significance of this rule and its now highly significant exceptions have not, to the author's knowledge, yet received close attention. A review of these findings seems overdue in view of the fact that some experiments suggest that the 11β-hydroxyl but not the 11-oxo form is responsible in the last analysis for the peculiar pharmacological activity of 11-oxygenated steroids.

The ready and general conversion of 11β-alcohols to the related ketones was obvious from comparisons of work on peripheral and adrenal venous blood (Hechter and Pincus[5]) and on urine (Lieberman and Teich[3]). The reverse reaction was first clearly shown by Burton *et al.*[35] who administered cortisone acetate and recovered hydrocortisone from the urine of 5 hu-

[23] I. E. Bush and M. Willoughby (unpublished).

[24] Reference substance kindly supplied by Prof. Dr. T. Reichstein.

[25] S. Burstein, K. Savard, and R. I. Dorfman, Endocrinology *52*, 448 (1953); *53*, 88 (1953).

[26] M. Ahrenstein in: Discussion at Fed. Meetings of Biological Society, Chicago, April 1953.

[27] W. Taylor, Biochim. biophys. Acta *15*, 592 (1954).

[28] E. Forchielli *et al.*, see: R. I. Dorfman, Ann. N. Y. Acad. Sci. *61*, 291 (1955).

[29] S. Burstein, R. I. Dorfman, and E. M. Nadel, Arch. Biochem. Biophys. *53*, 307 (1954).

[30] M. Sorkin and T. Reichstein, Helv. chim. Acta *29*, 1218 (1946).

[31] J. J. Schneider, J. biol. Chem. *183*, 365 (1950); *194*, 337 (1952).

[32] R. B. Burton, A. Zaffaroni, and E. H. Keutman, J. biol. Chem. *193*, 769 (1951).

[33] C. de Courcy, I. E. Bush, C. H. Gray, and J. B. Lunnon, J. Endocrinol. *9*, 401 (1953).

[34] E. M. Richardson, J. C. Touchstone, and F. C. Dohan, J. clin. Invest. *34*, 285 (1955).

[35] R. B. Burton, E. H. Keutman, and C. Waterhouse, J. clin. Endocrinol. Metab. *13*, 48 (1953).

man subjects. Bush[36] has found that patients receiving large doses of cortisone by mouth have large concentrations of hydrocortisone in the peripheral plasma but very little cortisone. The reductive direction of this reaction was also favoured in the perfused liver or liver homogenate experiments of many workers (e.g. Amelung *et al.*[37]; Caspi *et al.*[38]; Fish *et al.*[39]; Miller and Axelrod[40]). The interconvertibility of pairs of 11-oxygenated steroids has now been shown (in man) for the following substances:

Hydrocortisone ⇌ Cortisone
Corticosterone ⇌ 11-Dehydrocorticosterone
11 β-hydroxyandrost-4-en-3,17-dione ⇌ Adrenosterone
Tetrahydrohydrocortisone (5 β) ⇌ Tetrahydrocortisone (5 β)
Dihydrohydrocortisone (5 β) ⇌ Dihydrocortisone (5 β)

(Burton *et al.*[35]; Burstein *et al.*[25]; Lieberman *et al.*[3]; Savard *et al.*[41]; Savard and Goldfaden[42]; Richardson *et al.*[34]). Indeed it is now reasonable to consider these compounds as pairs, the numbers of each pair constituting a possible oxidation-reduction system.

The significance of this type of reaction is still not certain, and it might be held that it is no more interesting than the similar conversions of oxygen functions at C-17 or C-3. A case can be made however for considering this oxo/hydroxyl conversion at C-11 as of peculiar interest and of possible significance in the pharmacological properties of the C-11 oxygen function. Thus reductions at C-17 are at a relatively unhindered position and the 17α-ols predominate (Miller and Dorfman[43]) while oxidation of the 17-ketones occurs with both 17α- and 17β-ols (Dorfman *et al.*[44]; West and Samuels[45]; Pearson *et al.*[46]; Ungar *et al.*[47]; Kochakian and Nall[48]). While little is known of the specificity and reversibility of reactions of the saturated 3-alcohols, the irreversibility of the reduction of the Δ^4-unsaturated 3-ketones in the general tissues is well established (Savard and Goldfaden[42]; Ungar *et al.*[47]). In contrast, the reaction at C-11 is remarkably stereospecific in the reductive direction and, on the basis of the pharmacological inactivity of the 11α-epimers of hydrocortisone and corticosterone, one may assume that this also holds for the oxidative direction *in vivo*.

Interconversion of 11-oxo and 11-hydroxyl groups in man

Root steroid (11-hydroxy form)	Reactions demonstrated hydroxyl ⇋ oxo	Dominant form in man	
		Blood	Urine
Hydrocortisone	⇋	·OH	: O
Corticosterone	⇋	·OH	: O
11 β-hydroxyandrost-4-en-3,17-dione	←	·OH	·OH ?
(5 β)-pregnan-3 α, 11 β, 17 α, 21-tetrol-20-one	⇄	?	: O
(5 β)-pregnan-3 α, 11 β, 21-triol-20-one	⇋	?	: O
(5 β)-androstan-3 α, 11 β-diol-17-one	⇋	?	: O
(5 α)-pregnan-3 α, 11 β, 17 α, 21-tetrol-20-one	←	?	·OH
(5 α)-pregnan-3 α, 11 β, 21-triol-20-one	←	?	·OH
(5 α)-androstan-3 α, 11 β-diol-17-one	←	?	·OH

In the last five compounds it is not strictly true that these "reactions" have been demonstrated, since it is not known whether the reduction at C-3 and C-4,5 occur with 11-oxo, 11-hydroxy, or both forms. (See text for further interpretations.)

The special nature of this interconversion becomes more striking when one examines another aspect of its specificity. It is clear from the above papers (see also the Table) that the reaction is fully reversible for Δ^4-3-ketones of C_{19}, C_{17} 17-deoxy-, and C_{21} 17-hydroxy-series, and also for some (5β) 3-oxo and 3-hydroxy compounds. On the other hand, there is now sufficient evidence to suggest that with (5α)-3α-hydroxy steroids of all three series the reductive direction of the reaction predominates, while the oxidative direction is either impossible or extremely slow. Since this information comes from studies in which the 11-oxo forms of the related (5β) epimers were predominant in the same urine samples, there is no question of individual, or other, variation being involved. Thus, while both 5-epimers of 11-oxo-(5ε)-pregnan-3α,21-diol-20-one were found after administering corticosterone, only the 11-hydroxy form of the (5α) epimer was found (Engel *et al.*[17]; Richardson *et al.*[34]; Touchstone *et al.*[49]). In the case of adrenosterone (or naturally secreted 11β-hydroxyandrost-4-en-3,17-dione [Romanoff *et al.*[50]; Bush *et al.*[22]]) 11β-hydroxyandrosterone predominates in the urine (hydroxy/oxo forms = ca. 9·0), at the same time as 11-oxoetiocholanolone equals or pre-

[36] I. E. Bush (unpublished).
[37] D. Amelung, H. J. Hubener, L. Proha, and G. Meyerheim, J. clin. Endocrinol. Metab. *13*, 1125 (1953).
[38] E. Y. Caspi, H. Levy, and O. Hechter, Arch. Biochem. Biophys. *45*, 169 (1953).
[39] C. A. Fish, M. Hayano, and G. Pincus, Arch. Biochem. Biophys. *42*, 480 (1953).
[40] L. L. Miller and L. R. Axelrod, Metabolism *3*, 438 (1953).
[41] K. Savard, S. Burstein, H. Rosenkrantz, and R. I. Dorfman, J. biol. Chem. *202*, 717 (1953).
[42] K. Savard and S. H. Goldfaden, Fed. Proc. *13*, 288 (1954).
[43] A. M. Miller and R. I. Dorfman, Endocrinology *46*, 514 (1950).
[44] R. I. Dorfman, J. E. Wise, and R. A. Shipley, Endocrinology *46*, 127 (1950).
[45] C. D. West and L. T. Samuels, J. biol. Chem. *190*, 827 (1951).
[46] S. Pearson and D. McGavack, J. clin. Endocrinol. Metab. *14*, 472 (1954).
[47] F. Ungar, A. M. Miller, and R. I. Dorfman, J. biol. Chem. *206*, 597 (1954).
[48] C. D. Kochakian and D. M. Nall, J. biol. Chem. *204*, 91 (1953).
[49] J. C. Touchstone, H. Bulashenko, E. M. Richardson, and F. C. Dohan, Arch. Biochem. Biophys. *52*, 284 (1954).
[50] E. Romanoff, P. Hudson, and G. Pincus, J. clin. Endocrinol. Metab. *13*, 1546 (1953).

dominates in the (5β) series (Savard *et al.*[41]; Bush *et al.*[22]). Most workers agree in finding little or no 11-oxoandrosterone in human urine compared with the 11-hydroxy form; the earlier findings of Rubin *et al.*[51] seem to have been contradicted by later experience (Dorfman[52]; Gallagher[53]). Finally, in the C_{21}-17-hydroxy series we have found appreciable quantities of (5α)-pregnan-3α,11β,17α,21-tetrol-20-one (Reichstein's Substanz C) in normal human urine, and in the urine of Addisonian patients treated with cortisone, while the amount of the 11-oxo form must have been less than 1/20 this quantity to have escaped detection (Bush and Willoughby[23]).

Whatever the basis for these findings, they clearly indicate a fairly general rule since they apply to three very different types of steroids from both C_{21} and C_{19} series. They are summarized in the Table. It will be found that the simplest hypothesis to account for them, with one exception, must involve at least two special requirements for the system involved, however many enzymes are responsible. In all cases however one has to assume that *in vivo* the 11β-hydroxy (5α) form cannot be oxidized at C-11 or else that the redox equilibrium is very much in favour of the reduced form for the (5α) form alone. In the first case, the added restriction would be required that the (5α)-reducing enzyme did not attack the 11-oxo form at all *in vivo*.

Biological function of the 11-oxygenated steroids

Considerable emphasis has been laid on the interconversion of 11-oxo and 11-hydroxyl groups because it appears not unlikely to be related to the pharmacological influence of the C-11 oxygen function. This possibility has been raised previously (Burton *et al.*[35]; Hechter *et al.*[54]; Miller and Axelrod[40]). In the absence of any other satisfying hypothesis on this matter, it seems justifiable to pursue, in more detail than was possible previously, this particular line of argument, at the risk of seeming unduly speculative, if only to explore the full consequences of such an hypothesis, and to deduce from them suitable experimental tests. It is entirely possible that these interconversions are quite unrelated to pharmacological activity and belong merely to that large class of metabolic reactions by which pharmacological agents are modified until they become inactive products. The tentative hypothesis that this may not be so for the 11-oxygen function has been thought worthy of exploration for the reasons given earlier, but there exists further evidence supporting this conclusion which will be discussed in the following paragraphs*.

The type of activity described as "glucocorticoid" that is the peculiar property of the 11-oxygenated steroids is well known, and its numerous manifestations have been discussed fully by many authors (e.g. Sayers[55]; Verzár and Wang[56]; Shoppee[57]). Attempts to define the intimate chemical mode of action of these hormones have failed, and it seems unprofitable to try and juggle with the manifold enzymes, cofactors, cells, tissues, metabolites and electrolytes, that are known to be affected by them. At the present time, it seems more valuable to approach the problem from the opposite direction; namely, to try to limit the possible modes of action by considering the known chemical and biochemical properties of this peculiar oxygen function.

The first question arising from metabolic studies is whether we have any unequivocal evidence that the oxo forms of the 11-oxygenated corticosteroids are active in the molecular processes affected by these hormones. Considerable doubt is shed on a positive answer to this question by the findings of Hollander *et al.*[58] that local intra-articular injection of inflamed joints with hydrocortisone produced considerable objective improvement in function and subjective improvement as loss of pain and stiffness, whereas cortisone was ineffective. This finding has been confirmed by numerous workers and was carefully followed up by Zacco *et al.*[59] and Wilson *et al.*[60] who examined synovial fluid from such patients for steroid metabolites. It was shown that differences in solubility and rate of disappearance of the two compounds could not account for the difference in therapeutic activity. In addition, it was shown that, while numerous metabolites were formed, the pattern of these differed for the two compounds and that very little hydrocortisone was formed from cortisone, and in some cases none.

Most other studies of the local action of these hormones *in vitro* or on prefused organs have unfortunately not involved an examination of the steroids formed from those administered. Most of these suggest that hydrocortisone is active while cortisone is very much less active or not active at all. Most of the cases in which cortisone was active involved tissues such as

* *Added in proof:* H. J. Hubener, D. K. Fukushima, and T. F. Gallagher, J. biol. Chem. *220*, 499 (1956) have recently given remarkable support to this contention by showing that reduction of 11-ketones by liver homogenates occurs with Δ^4-3-oxosteroids but *not* with 3α-hydroxy-(5β)-steroids.

[51] B. L. Rubin, R. I. Dorfman, and G. Pincus, Recent Progr. Hormone Res. *9*, 213 (1954).

[52] R. I. Dorfman, In: 5th Conference on the Adrenal Cortex (Josiah Macy Jr. Foundation, New York 1954).

[53] T. F. Gallagher, In: 5th Conference on the Adrenal Cortex (Josiah Macy Jr. Foundation, New York 1954).

[54] O. M. Hechter, M. M. Solomon, and E. Caspi, Endocrinology *53*, 202 (1953).

[55] G. Sayers, Physiol. Rev. *30*, 241 (1950).

[56] F. Verzár and F. C. Wang, Amer. J. Physiol. *159*, 263 (1949).

[57] C. W. Shoppee, Symposium on Steroids, 2nd International Congress of Biochemistry, Paris 1952.

[58] J. L. Hollander, E. M. Brown, R. A. Jessar, and E. Y. Brown, J. Amer. med. Ass. *147*, 1629 (1951).

[59] M. Zacco, E. M. Richardson, O. Crittenden, J. L. Hollander, and F. C. Dohan, J. clin. Invest. *14*, 711 (1954).

[60] H. Wilson, R. Fairbanks, D. Scialabba, C. McEwen, and M. Ziff, J. clin. Endocrinol. Metab. *16*, 86 (1956).

liver where reduction to the 11-hydroxyl form is known to occur. In no case where cortisone was active locally is it possible to be sure that conversion to hydrocortisone did not occur (Ashton and Cook[61]; Roberts and Szego[4]; Leslie[62]; Balmain *et al.*[63]; DuBois[67]). In the studies of Hollander *et al.*[58] and Chiu[64]; Grant and Taylor[65]; Sinex[66]; Cochran and Wilson *et al.*[60] however, we know that the inability of the synovial tissues to reduce cortisone effectively to hydrocortisone was correlated with inactivity of the former. While in this case we are dealing with the "pharmacological" (i.e. "anti-phlogistic" or "anti-collagen disease") actions of these hormones, the results throw some doubt on the idea that both the 11-ketones and the 11β-alcohols are biologically active. As mentioned above, in the whole organism the circulating steroid is almost entirely in the hydroxyl form, whatever the administered form.

In his stimulating review, Hechter[68] has pointed out that the hypothesis that hormones act as co-factors or similar reagents in enzymic reactions, has not yet been vindicated by results. It is necessary to emphasize at this stage that this discussion of the possible significance of oxo/hydroxyl interconversion is not meant to suggest that such a reaction must be of the *coenzyme* type. However, the possibility exists that the actual mode of action of these hormones, at the molecular level, is of this nature, the crucial reaction being the oxidation of the hydroxyl form, with reduction of the oxo form being carried out by another enzyme, not necessarily in the same tissue (e.g. absent from synovial tissues). While agreeing with Hechter's general position, therefore, the author feels that this possibility should not be neglected.

While it is not possible to go any further (i.e. at the molecular level) on the basis of biochemical findings at present available, one can attempt to set limits to the possible chemical reactions involved in the mode of action of these hormones, using the physico-chemical facts at present known. It does not matter whether a substance acts by being coenzyme, carrier, inhibitor, or other known or unknown class of reagent, the introduction of a special type of pharmacological activity by introducing one grouping can only happen in a limited number of ways. These can be generalized as follows:

(a) The group inhibits the inactivation of the substance;

(b) it activates another region of the molecule to undergo reactions;

(c) it undergoes a specific reaction itself, usually an exchange or other reversible reaction;

(d) it alters the distribution of the root molecule at cellular or molecular levels, or at both.

In the case of the 11-oxygen function we know that, if anything, this group increases the rate of inactivation of the root substance. Again, the present evidence suggests that electronic effects on the rest of the molecule, while present, are small, although no information is available on the effects on the sidechain of the corticosteroids. We are therefore left with the last two possibilities. As far as (d) is concerned, it has already been pointed out that mere alteration of distribution, by change in solubility caused by introduction of the 11-oxygen function, is unlikely to be a sufficient explanation of its pharmacological effects. Again, there are severe steric limits placed on the formation of any stable linkage with 11-oxo or 11β-hydroxyl groups at low temperatures and pressures, so that attachment to specific groups of enzymes, proteins, or cellular surfaces by this type of groups seems highly unlikely, though not impossible. On the other hand, there is already evidence to hand that (c) can and does occur with the oxygen function in question, and that the oxidized form is inactive in a situation where reduction to the alcohol is impossible or limited.

It was suggested earlier that the pronounced effect of introducing 9α-halogen atoms is probably due to electronic effects at C-11. This is not unlikely since the inductive effect of the halogen atom α to the 11-oxygen function will be appreciable. If however oxidation/reduction at C-11 is involved in the mechanism of action of these hormones, an alternative explanation of the action of 9α-halogen atoms is possible. In view of the stereochemical specificity of this oxidation/reduction system, it may be compared with the action of the metal hydrides; in other words, the reduction probably involves proton attack from a donor approaching from the α-side of the molecule. If an enzyme is responsible, this would be the expected direction of attack, and the halogen atom might act by association with the active site on the enzyme by polar interaction or actual hydrogen bonding. This type of action would be very sensitive to steric factors, which would explain the negative effect of the very large iodine atom.

In *summary*, then, it has been suggested that present data enable us to place considerable limits on the possible modes of action of the C-11 oxygen function on physico-chemical grounds. It has also been suggested that one observed type of reaction at this position will satisfy those limits. However, it should be obvious that the large number of, as yet unknown, factors involved forbids us to go further and say that this reaction is indeed the basis of the pharmacological

[61] N. Ashton and C. Cook, Brit. J. exp. Path. *33*, 445 (1952).
[62] I. Leslie, Biochem. J. *52*, 21 (1952).
[63] J. H. Balmain, S. J. Folley, and R. F. Glasscock, Nature (London) *169*, 447 (1952).
[64] C. Y. Chiu, Biochem. J. *46*, 120 (1950).
[65] J. K. Grant and W. Taylor, Biochem. J. *52*, 24 (1952).
[66] F. M. Sinex, Fed. Proc. *10*, 247 (1951).
[67] K. W. Cochran and K. P. DuBois, Fed. Proc. *11*, 333 (1952).
[68] O. M. Hechter, Vitam. and Horm. *13*, 293 (1955).

activities of this oxygen function. The suggestive correlation between certain pharmacological results and purely chemical considerations is at the moment tenuous, since many more examples are needed before such inductions can command our confidence. These correlations should, however, encourage us to perform experiments designed to confirm or invalidate the tentative theory outlined above.

Speculation is often sterile, and in the biochemical field inductive arguments from incomplete data are particularly prone to be upset by even small additions to that data. When however a suggestive arrangement of existing data can be made, and no other is yet obvious, it does no harm to examine the consequences of such an arrangement. The application of William of Occam's Razor suggests that the hypothesis that oxidation/reduction at C-11 may be the basis of the biological action of the cortico-steroids is not unworthy of experimental trial, but no one, least of all the author, will be surprised if once again William's shave is postponed by the blunting action of a Baconian Experiment.

Acknowledgments.–The author is greatly indebted to Professor G. W. Pickering, M. D., F. R. C. P., and St. Mary's Hospital Medical School for support in the last three years. In his own work on this field, he has relied heavily during this period on the skilled and tireless assistance of Miss Muriel Gale.

Zusammenfassung

Es wird versucht, die möglichen Zusammenhänge zwischen den physiko-chemischen Eigenschaften der C_{11}-Gruppe, dem Stoffwechsel und der biologischen Wirkung der 11-Oxysteroide aufzuzeigen. Die Bedeutung der reversiblen Oxydationreduktion dieser Gruppe wird besonders hervorgehoben.

On the Intraneural State of Acetylcholine*

By O. Loewi[1], New York

From experiments following soon after the discovery of the chemical transmission of nervous impulse it was concluded that the primary action of the impulse propagated in cholinergic nerves consists in increased synthesis by the nerve-endings of ACH (Acetylcholine) which subsequently is released[2]. Later it was demonstrated that the nerve-endings during nerve stimulation do indeed synthetize ACH but only secondary to its release and in an amount just compensating for the loss[3]. In fact, intact cholinergic nerves even under conditions such as isolation and rest, where continuous destruction and resynthesis is most improbable, maintain a fairly constant level of ACH in spite of the simultaneous presence of cholinesterase. The apparent protection from esterase is regarded as an indication that the ACH is present in the organs in an indiffusible state preventing contact with the esterase. The extent of this protection and the difference in fate between freely diffusible ACH and that present in an isolated, inactive organ is clearly shown in experiments[4] in which the ventricle of a frog heart was divided in two. The ACH was determined immediately in one half and after an hour in the second half: the values were found to be identical. In another experiment ACH was added at the start to the second half. After an hour the ACH content was found to be equal the original value, indicating that only the added diffusible ACH was destroyed.

There arises the question of whether the total content of ACH is indiffusible also in non-isolated, resting organs. The answer to this question is necessary for recognizing the activities by which the nervous impulse leads to the release of ACH: if the whole ACH is present within the nerve and especially its endings in an indiffusible state, the nervous impulse has to render part of it diffusible and to release it. If a part is diffusible, the nervous impulse has only to release it from the nerve-endings. There exist so far no conclusive experiments on the state of ACH—by the way also of epinephrine—in the respective nerves, because of the inadequacy of the methods used. It therefore cannot yet be decided which of the alternatives just mentioned is realized.

In order to fill this gap it seems advisable to investigate whether the state of ACH within nerves could be disclosed by application to nerve homogenates of the method of differential centrifugation. This method, by which mitochondria could be isolated for the first time, has lately been used to separate from organ homogenates granules that fix in an inactive, indiffusible state highly active, endogenous amines such as the

* In honor of Prof. Fritz Verzár on his seventieth birthday.

[1] Department of Pharmacology, New York University College of Medicine, New York.

[2] W. R. Witanowski, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *208*, 694 (1925). – E. Engelhart, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *225*, 721 (1930); *227*, 220 (1931).

[3] A. Vartiainen, J. Physiol. *82*, 282 (1934). G. L. Brown and W. Feldberg, J. Physiol. *80*, 265 (1936). G. Kahlson and F. L. MacIntosh, J. Physiol. *96*, 277 (1939). – W. Feldberg, J. Physiol. *103*, 367 (1945).

[4] E. Engelhart and O. Loewi, Arch. int. Pharmacodyn. *38*, 287 (1930).

pressor amines in the adrenal medulla[5] and histamine in liver, spleen and lungs[6]. The granules appear, like mitochondria, to be surrounded by a semipermeable membrane, since it has been shown that influences, interfering with the integrity of living membranes, such as hypotonicity of the medium, freezing and thawing, or surface active agents (e.g. saponin and lysolecithin) cause the release of catechol amines or histamine from the respective granules. Moreover, the sedimentation properties of these granules are very similar to those of the mitochondria. It has therefore been suggested that at least a large portion of the particles may be identical with the latter.

Quantitative determination of the particulate portion of the amines in the adrenal medulla, lung and liver revealed that it amounted to 70 to 90% of the whole amine content of the homogenates. It is possible that part of the amines may be free also in the living cells– perhaps in equilibrium with the fixed portions. On the other hand it cannot be excluded that the whole content of amines in living cells may be fixed, the small part found free in the homogenates being due to artefacts such as mechanical disruption of granules during their preparation or to the inappropriate character of the suspending fluid. The latter was found to be true for example for isotonic Ringer solution, an adequate medium for intact cells. This is not astonishing since the ionic composition of this solution differs widely from that of the cytoplasmic fluid that normally surrounds intracellular structures. It might be worthwhile to check a suspending fluid whose ionic composition would correspond to that of the cytoplasm. Such a medium would seem preferable to the quite generally used sucrose solution, which, in spite of its unphysiological character, has so far proved to be superior to any other suspending fluid for the isolation and preservation of mitochondria and the aforementioned other particles.

I have called attention to the results obtained with catechol amines and histamine in order to justify the previous recommendation that the method of differential centrifugation should be applied to the problem of the intraneural state of the amine ACH.

We now have to refer to the outcome of experiments, devoted to this question in the past. In these the organs were simply extracted with eserinized, neutral Ringer solution. After extraction of the finely minced central nervous system of frogs[7] or the homogenized brain of rats[8] the bulk of ACH was found in the insoluble residue. And by extraction of the brain with hypotonic solution the greater part of the fixed ACH was released[9]. This effect of hypotonicity of the medium suggested that the ACH in the brain is largely if not entirely located in membrane-surrounded particles perhaps identical with mitochondria[10].

Quite different results were obtained with a peripheral cholinergic nerve. When the vagus taken from freshly slaughtered cattle was immediately minced and extracted in the same way as the central nervous system, no ACH was found in the insoluble residue[10]. This finding, however, is not definite proof against the occurrence in the intact nerve of particulate matter containing ACH, since particles from peripheral nerves might not withstand exposure to Ringer solution as well as particles from brain. It would certainly be desirable to apply to nerve homogenates the method of differential centrifugation which has disclosed the presence of particles in cases where other methods had failed.

Whereas brain and peripheral nerve differ greatly in the extractability of their ACH by Ringer solution they behave identically on extraction with acidified aqueous fluids. They extract their total ACH. The same holds true for extraction with acidified alcohol (m/100 HCl-alcohol). This, however, becomes evident only after treatment of the dried alcoholic extract with acidified aqueous solution[7]; but after suspension of the alcoholic extract in Ringer solution, one detects in the filtrate only about 40% of the total ACH content of the organs[11]. One therefore has to conclude that the major portion of ACH is present in the alcoholic extract in a water insoluble, inactive complex. This complex is soluble in ether, in which ACH *per se* is almost insoluble; after the evaporation of the ether the ACH can be extracted from the residue by aqueous solutions[12].

A behaviour analogous to that of ACH was later shown for the catechol amines and histamine: von Euler[13] demonstrated that catechol amines, present in an alcoholic extract of adrenergic nerves or added to an ethereal solution of lecithin or cephalin, became partly soluble in ether and could be extracted from it by aqueous solutions.

Quite recently Lindahl[14] found in *in vitro* experiments that also the ether insoluble histamine combines

[5] H. Blaschko and A. D. Welch, Arch. exp. Path. Pharm. *219*, 17 (1953). – H. Blaschko, P. Hagen, and A. D. Welch, J. Physiol. *129*, 27 (1955). – N.-A. Hillarp, S. Lagerstedt, and B. Nilson, Acta physiol. scand. *29*, 251 (1953).

[6] J. H. Copenhaver, M. E. Nagler, and A. Goth, J. Pharmacol. *109*, 401 (1953). – P. Hagen, Brit. J. Pharmacol. *9*, 100 (1954). – A. L. Grossberg and H. Garzia-Arocha, Science *120*, 762 (1954). – J. L. Mongar and O. H. Schild, J. Physiol. *131*, 207 (1956).

[7] O. Loewi, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *239*, 430 (1937). – O. Loewi and H. Hellauer, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *240*, 449 (1938).

[8] K. A. C. Elliott and N. Henderson, Amer. J. Physiol. *165*, 365 (1951).

[9] E. Brodkin and K. A. C. Elliott, Amer. J. Physiol. *173*, 437 (1953).

[10] O. Loewi and H. Hellauer, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *240*, 769 (1938).

[11] O. Loewi and H. Hellauer, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *240*, 449 (1938); 769 (1938).

[12] O. Loewi, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *239*, 430 (1937). – O. Loewi and H. Hellauer, Pflüg. Arch. ges. Physiol. *240*, 449 (1938); 769 (1938).

[13] U. von Euler, Acta physiol. scand. *12*, 73 (1946).

[14] K. H. Lindahl, Acta physiol. scand. *35*, 146 (1955).

with the aforementioned phosphatides to form ether soluble complexes.

Because of the similarity between the above findings and the behaviour of ACH it is probable that also the latter forms complexes with phosphatides.

The observations we just referred to obviously do not justify the conclusion that amine-phospholipid complexes are formed also in the living cells. It could be that the lipids and the amines are simultaneously extracted from tissues as separate entities and that the complexes are formed only when they accidentally meet *in vitro*. On the other hand, the possibility exists and has been discussed[15] that water-insoluble amine-phosphatide complexes are formed also *in vivo*. In favor of this view one could refer to the fact that phosphatides are widespread in the tissues and that the catechol amines fixing granules in the adrenal medulla were found to be especially rich in phospholipids; in fact they amounted in the granules to 50% of the phospholipid content of the whole medulla[16].

It was mentioned before that one factor responsible for the indiffusible state of the amines, contained in particles, might be that these presumably are surrounded by a semipermeable membrane. Another contributing factor, perhaps related to this could be the presence at or in the granules of amine-phospholipid complexes which might be easily split under conditions leading to release of amines[17]. Here changes of the pH may play an important part, because it has been shown that the distribution of catecholamines[18] and histamine [14] between the solid, aqueous, and ethereal phases depends largely upon the prevailing pH.

This essay started from the question of the intraneural state of ACH. The answer had to be restricted to the presentation of possibilities. I have stressed the individual data from which they emerged, in the hope that some of the reflections may indicate directions for future progress in the field.

Zusammenfassung

Durch differenzierende Zentrifugierung von homogenisierten Organen wurde neuerdings nachgewiesen, dass die stark wirksamen, körpereigenen Amine Histamin, Adrenalin und Noradrenalin in Partikeln enthalten sind, die offenbar von halbdurchgängigen Membranen umgeben sind. Reagenzglasbefunde machen es ferner wahrscheinlich, dass diese Amine mit Phosphorlipoiden wasserunlösliche Komplexe bilden. Es sind bereits Anhaltspunkte dafür vorhanden, dass das in nervösen Organen vorhandene Acetylcholin sich den anderen Aminen analog verhält. Sollte sich durch künftige Versuche, für deren Durchführung gewisse Vorschläge gemacht werden, diese Annahme als richtig erweisen, so wäre die Unfähigkeit des Acetylcholins, in ruhenden Organen zu diffundieren, und damit seine Inaktivität und sein Schutz gegen die Esterasewirkung erklärt.

[15] U. von Euler, Acta physiol. scand. *12*, 73 (1946). – O. Norlander, Acta physiol. scand. *21*, 326 (1950). – N.-A. Hillarp and B. Nilson, Acta physiol. scand. *31*, [Supplem. 113] 79 (1954).

[16] N.-A. Hillarp and B. Nilson, Acta physiol. scand. *32*, 11 (1954).

[17] U. von Euler, Acta physiol. scand. *12*, 73 (1946). – N.-A. Hillarp and B. Nilson, Acta physiol. scand. *31*, [Supplem. 113] 79 (1954).

[18] O. Norlander, Acta physiol. scand. *21*, 326 (1950).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Présence d'uraninite dans les minéraux accessoires du granite de baveno

Dans le cadre d'une étude sur la distribution de la radioactivité dans les roches éruptives par la méthode photographique[1], nous avons trouvé dans le granite de Baveno (Alpes italiennes), des inclusions microscopiques dont la radioactivité α correspond à une teneur en Uranium supérieure à 50%. La présence de minéraux accessoires aussi actifs dans un granite a été rarement signalée[2] et présente un grand intérêt dans le problème de la métallogénie de l'Uranium. Sur une surface totale de 400 cm^2 (lames minces et sections polies) exposée à des émulsions Ilford C 2, on a trouvé 6 inclusions de surfaces comprises entre 10^{-6} et $8{,}4 \cdot 10^{-5}$ cm^2 dont l'activité spécifique est en moyenne de 200 $\alpha/cm^2 \cdot s$ (mesurée sur les cristaux les plus grands pour être dans les conditions d'émission en couche épaisse).

Cette activité est due à la famille de l'Uranium. En effet, sur 30 000 α émis par les 6 inclusions, nous n'avons trouvé aucune trajectoire dont le parcours dans l'émulsion est supérieur à 39 μ (l'α du RaC′ a un parcours de 36 μ, celui du ThC′ est de 47 μ). Le rapport Thorium-Uranium est donc inférieur à $5 \cdot 10^{-3}$. L'absence de Thorium est confirmé par le rayon des halos pléochroïques entourant deux de ces inclusions dans la biotite. La concentration en Uranium de ces minéraux calculée par les

[1] E. Picciotto, Bull. Soc. géol. *59*, 170 (1950).

[2] R. Coppens, C. r. Acad. Sci. *228*, 176 (1949); *229*, 617 (1949). – K. E. Beer, Geol. Survey Gt. Brit. and Museum, Atomic Energy Div. Report n° 123 (1952). – E. S. Larsen et G. Phair, *Nuclear Geology* (John Wiley and Sons, New York 1955). – O. Hieke-Merlin, E. Picciotto et S. Wilgain, Mem. Ist. geol. min. Univ. Padova *19*, (1955); Geochim. et cosmochim. Acta (sous presse). – M. Roubault et R. Coppens, C. r. Acad. Sci. *240*, 1748 (1955).

formules classiques d'émission en couche épaisse est de 62%. En section mince, les inclusions se présentent comme des cristaux prismatiques opaques (Fig. 1 et 2). D'après ces propriétés, on peut conclure qu'il s'agit de cristaux d'uraninite.

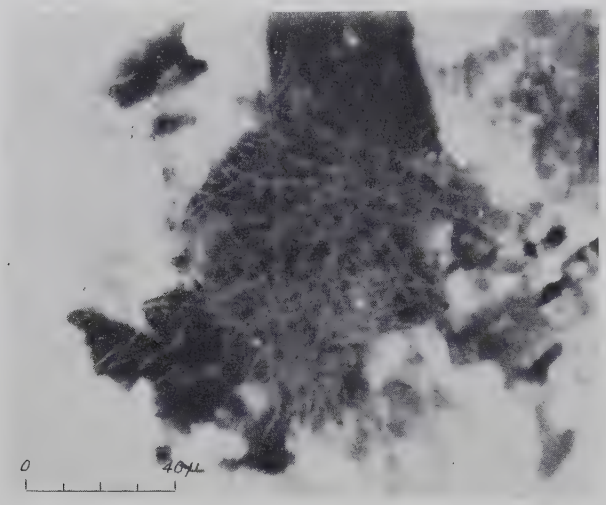


Figure 1.

Dans le Tableau, nous donnons une estimation de la proportion relative de l'uraninite et de sa contribution à la radioactivité totale du granite.

Activité spécifique moyenne du granite:	$9 \cdot 10^{-4}$ α/cm²· s
Activité spécifique de l'uraninite:	200 α/cm²· s
Fraction de l'activité totale due à l'uraninite:	0,1
Fraction du volume de la roche occupé par l'uraninite:	$5 \cdot 10^{-7}$

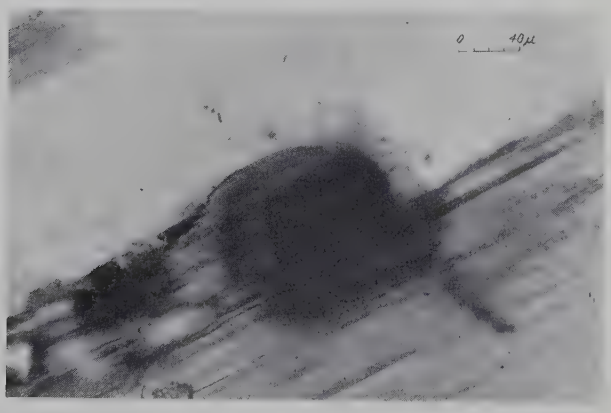


Figure 2.

L'activité α moyenne du granite de $9 \cdot 10^{-4}$ α/cm²· s est tout à fait normale et correspond à une teneur en Uranium de $3 \cdot 10^{-6}$ g/g en supposant Th/U = 3.

Environ 10% de l'activité totale sont dues à des inclusions d'uraninite occupant moins de 1 millionième du volume total de la roche et dont l'activité spécifique est 200 000 fois plus élevée que la moyenne de la roche. Ce cas extrême illustre bien l'hétérogénéité de distribution de l'Uranium dans les roches granitiques.

Bien que nous ne disposions pas encore d'un matériel suffisant il faut noter que d'après les critères pétrographiques généralement admis, l'uraninite semble être ici un minéral accessoire primaire, contemporain de la formation de l'ensemble de la roche et non le résultat d'un apport hydrothermal ultérieur.

Il est certain que la majorité de l'Uranium des granites se trouve dans des minéraux où il n'entre pas comme constituant chimique majeur, mais dans le cas présenté ici, une fraction appréciable d'Uranium de la roche est contenue dans un minéral proprement d'Uranium. Il est possible que ce cas soit plus fréquent qu'on ne le pense, car les très faibles quantités d'uraninite qu'on pourrait attendre ont certainement pu échapper aux méthodes utilisées jusqu'à présent. La méthode photographique permettra de préciser cette question.

S. Deutsch et E. Picciotto

Laboratoire de Physique Nucléaire, Université Libre de Bruxelles, le 6 juin 1956.

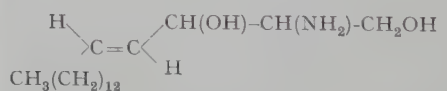
Summary

Microscopic crystals of uraninite are found in the accessories of the Baveno granite by the nuclear photographic emulsion technique. The uraninite is believed to be a primary mineral of the granite, its concentration in the sample is less than 1 p.p.m. but it contributes about 10% of the total α activity.

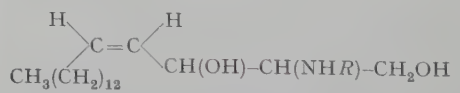
Synthese der *cis*-erythro- und *cis*-threo-Formen des Sphingosins

Wir beschrieben vor kurzem ein Verfahren zur stereospezifischen Synthese der erythro- bzw. threo-Form des N-Acetyl-1,3-dihydroxy-2-amino-4-octadecins (I*a*)[1]. Durch partielle Reduktion der Dreifachbindung in diesen beiden Verbindungen mit Natrium und Butanol oder durch Reduktion der entsprechenden Basen I*b* mit Lithiumaluminiumhydrid konnten sowohl die natürliche *trans*-erythro-Form als auch die *trans*-threo-Form des Sphingosins (II) erhalten werden.

$CH_3(CH_2)_{12}C{\equiv}C{-}CH(OH){-}CH(NH\mathit{R}){-}CH_2OH$ I*a* R = Ac; I*b* R = H



II



III *a* R = Ac, *b* R = H

Im Bestreben, alle möglichen stereoisomeren 1,3-Dihydroxy-2-amino-4-octadecene zugänglich zu machen, wurden die beiden N-Acetyl-1,3-dihydroxy-2-amino-4-octadecine (I*a*) der partiellen *cis*-Hydrierung mit Lindlar-Katalysator[2] unterworfen. Aus der erythro-Form von I*a* entstand N-Acetyl-*cis*-erythro-1,3-dihydroxy-2-amino-4-octadecen (III*a*), Smp. 70–71°, welches bei der alkalischen Hydrolyse die rac. *cis*-erythro-Form III*b*, Smp. 72–73°, des Sphingosins lieferte (Triacetylderivat Smp. 83–84°).

[1] C. A. Grob und F. Gadient, Chem. and Ind. *1956*, 660.
[2] H. Lindlar, Helv. chim. Acta *35*, 446 (1952).

Entsprechende Behandlung der threo-Form von I*a* lieferte N-Acetyl-*cis*-threo-1,3-dihydroxy-2-amino-4-octadecen (III*a*), Smp. 97–99°, bzw. die freie Base III*b*, Smp. 42–44° (Triacetylderivat Smp. 40–41°). Damit sind alle vier stereoisomeren Racemate mit Sphingosinstruktur zugänglich geworden.

Es ist bemerkenswert, dass die obigen beiden *cis*-Formen des Sphingosins III*b* kristallisierbar sind, während die beiden *trans*-Formen II bisher nur wachsartig erhalten werden konnten[1]. Die eingehende Beschreibung dieser Versuche soll an anderer Stelle erfolgen.

C. A. Grob und F. Gadient

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel, den 26. Juni 1956.

Summary

The synthesis of *cis*-erythro- and *cis*-threo-1,3-dihydroxy-2-amino-4-octadecene, two further stereoisomers of sphingosine, is described.

Thermodynamics of the *cis-trans* Interconversion of Dichlorobis-(ethylenediamine)-cobalt (III) Chloride

The *cis-trans* interconversion between the praseo and violeo complexes was discovered by Jorgensen[1]. The authors have reported on the rate of this interconversion elsewhere[2].

Trans-$[Co(en)_2Cl_2]Cl$[3] was prepared as described by Bailar[4]. The green *trans* form is spontaneously converted into a violet *cis* form on standing in aqueous solution. The conversion was followed with a Beckman D. U. spectrophotometer using 1·00% by weight (0·035 *M*) solutions of the *trans* form in all cases. It was found from a study of the spectrum of the *cis* and *trans* forms that a wave length of 6000 Å was suitable for following the reaction. The temperature was controlled to ± 0·2°.

The system was allowed to come to equilibrium at the desired temperature and the equilibrium concentrations of the *cis* and *trans* forms were calculated from the measured transmittances. Then,

$$K_c = \frac{[cis]}{[trans]} .$$

The results are summarized in the Table.

t (°C)	K_c
1·5	0·129
23·0	11·60
36·3	87·40

The heat of conversion, ΔH, was found to be 31·4 kcal/mole from a plot of log K_c versus $1/T$.

D. T. Haworth, E. F. Neuzil, and S. L. Kittsley

Department of Chemistry, Marquette University, Milwaukee, Wisconsin, June 7, 1956.

[1] S. M. Jorgensen, J. prakt. Chem. *39*, 18 (1889); *41*, 449 (1890).
[2] D. T. Haworth, E. F. Neuzil, and S. L. Kittsley, J. amer. chem. Soc. *77*, 6198 (1955).
[3] Ethylenediamine is designated as en.
[4] J. C. Bailar, *Inorganic Syntheses*, vol. II (McGraw-Hill Book Co. New York, 1946), p. 223.

Zusammenfassung

Trans-$[Co(en)_2Cl_2]Cl$[5] wird in wässriger Lösung in die *cis*-Form umgewandelt. Die Konzentrationen der beiden Formen, die miteinander im Gleichgewicht stehen, wurden gemessen und bei verschiedenen Temperaturen die Gleichgewichtskonstanten nach der Formel

$$K_c = \frac{cis}{trans}$$

berechnet.

[5] en = $H_2NCH_2CH_2NH_2$.

Sterol from *Aegle marmelos*

In a previous communication[1], aegelin, isolated from the leaves of *Aegle marmelos* Correa (N. O. Rutaceae) by Chatterjee and Bose[2], has been shown to be a neutral alkaloid and not a sterol. Recently, an attempt was made to isolate the real sterol constituent of leaves of *Aegle marmelos* following the normal procedure for isolation of sterols from plants. For this purpose the ethereal extract after separation of aegelin by the method of Chatterjee and Bose[2] was saponified with strong alcoholic potash and then distilled in steam to remove volatile oils. The non-volatile, non-saponifiable fraction was obtained by extraction with ether. The product was then chromatographed following the procedure adopted by Chakravarti and Dutta[3] for isolation of stigmasterol from *Enhydra fluctuans*. From the petroleum ether–benzene (1:1) fraction a crystalline product was obtained which after proper purification crystallized from alcohol in shining plates, m. p. 144–145°, $[\alpha]_D^{18} = -40°$ ($CHCl_3$), yield, 0·05%. The product has the molecular formula $C_{29}H_{50}O$, and has been identified with γ-sitosterol [acetate, m. p. 140–141°, $[\alpha]_D^{16} = -47°$ ($CHCl_3$); benzoate, m. p. 150–151°, $[\alpha]_D^{16} = -17°$ ($CHCl_3$)].

R. N. Chakravarti and B. Dasgupta

Department of Chemistry, School of Tropical Medicine, Calcutta, India, May 15, 1956.

Zusammenfassung

γ-Sitosterol wurde aus Blättern von *Aegle marmelos* Correa isoliert.

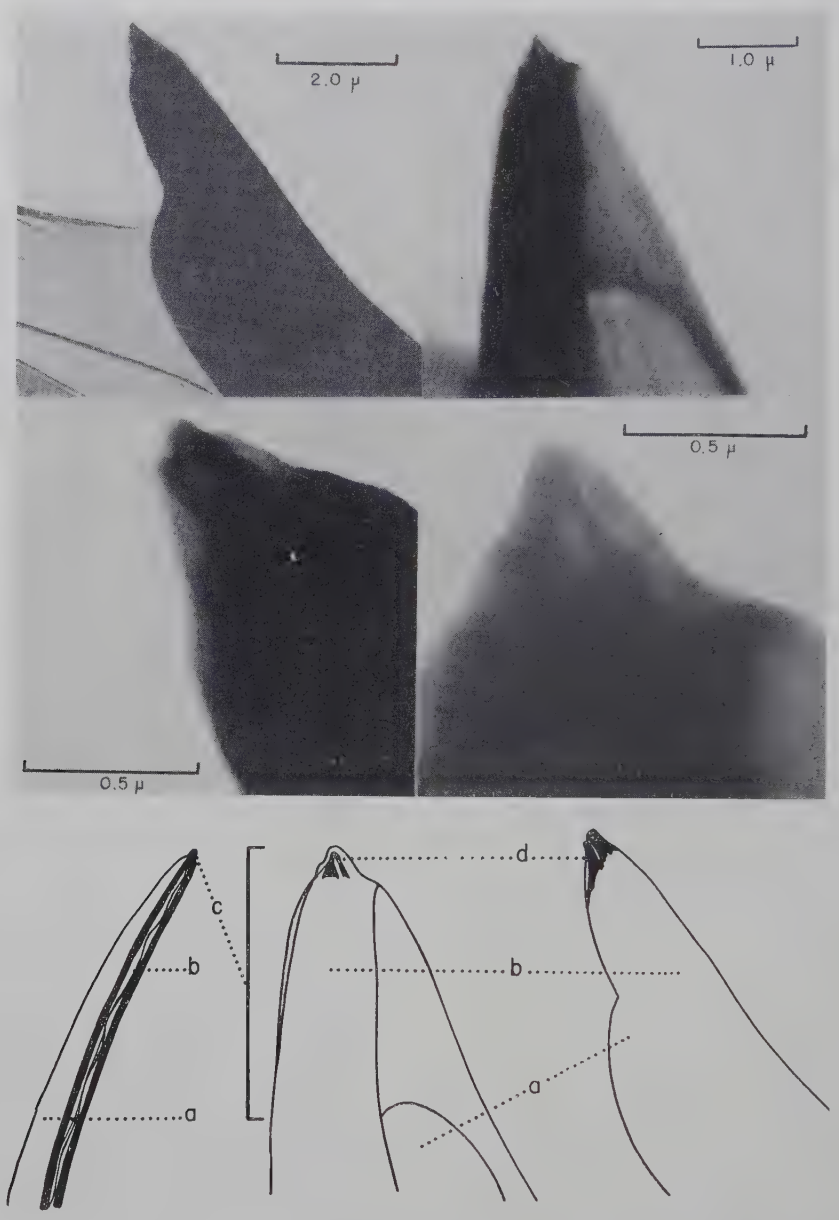
[1] R. N. Chakravarti and B. Dasgupta, Chem. and Ind. *1955*, 1632.
[2] A. Chatterjee (nee Mookerjee) and S. Bose, J. Indian chem. Soc. *29*, 425 (1952); Chem. Abstr. *47*, 10544 (1953).
[3] R. N. Chakravarti and A. Dutta, J. Indian chem. Soc. *29*, 374 (1952).

The Electron Microscopy of Chemosensory Hairs

One of the most sensitive sugar receptors known is that occurring in chemoreceptive hairs on the mouthparts and legs of flies. By means of these receptors flies are able to discriminate between water and sucrose solutions as dilute as 1×10^{-8} to 1×10^{-7} *M*. Such low threshold values prompt the question of how sensitive the receptors actually are in terms of the minimum number of mole-

cules required to effect stimulation. Recent preliminary studies of the receptor with the electron microscope have revealed details of the site at which the stimulating molecules join the biological system. On the basis of this information it is possible to place some limitations on the number of molecules taking part in the interaction at threshold.

portion sensitive to chemical stimulation[1]. Furthermore, it is known with reasonable certainty that of the 2 fibers terminating here one is sensitive to certain sugars while the other mediates responses to a wide variety of compounds which have in common only the characteristic of being repellent to the insect.



Electronmicrographs of the tip of a chemoreceptive hair from the labellum of the blowfly *Phormia regina* Meigen: *a* thin-walled cavity; *b* thick-walled cavity containing the distal fibers of the neurons; *c* terminal papilla; *d* receptor area of the hair (photographed through the courtesy of E. Kafig, U. S. Naval Medical Research Institute).

The hairs which contain the sugar receptors of the blowfly *Phormia regina* range in length from 30 to 300 μ. Each is characterized by the presence of 2 lumina, a thin-walled one continuous with the body of the hair-generating cell (trichogen), and a thick-walled one containing 2 fibers from 2 of the 3 subhypodermal bipolar sensory neurons. It has been shown that these fibers terminate in the tip of the hair and that the extreme tip is the only

The light microscope does not reveal any of the structure of the terminus of the hair other than the existence of a small papilla which reacts selectively to silver stains and is more permeable than other portions of the hair surface.

[1] V. G. Dethier, Quart. Rev. Biol. *30*, 348 (1955).

Electron microscopy of unfixed whole mounts reveals that the papilla is actually a prolongation of the thick-walled portion beyond the thin-walled portion (Fig. *c*). The large lumen of the thin-walled section clearly ends some 1 to 2·6 μ below the tip in the particular hairs examined here. There is very little likelihood of the large lumen having any direct connection with the process of stimulation.

The continuing portion of the hairs gradually begins to taper and then forms a small plateau on which is perched a minute cone-like papilla the base of which is 0·7 μ in diameter (Fig. *d*). 2 features of the tip of this cone are particularly noteworthy. First, the cone is clearly invested in a membrane approximately 200–300 Å thick. Second, there are 2 stable structures within the tip. Even in hairs which have been allowed to dry for 2 months the structures are discernible in whole mounts. Each ranges in diameter from 500–700 Å. In location and topographical relationships these structures correspond to the 2 nerve fibers predicted from behavioral and electrical studies and actually observed histologically farther down the shaft. The terminal structures are smaller in diameter than the fibers at more proximal locations. It is probable, though not yet demonstrable, that the fibers are structurally modified at the tip. Studies now in progress on sectioned material are expected to reveal more details of the tip.

The terminal process is, however, functionally specialized. Under normal circumstances only the extreme tip of the hair is sensitive to stimulation by sugar. When the tip is amputated chemical stimulation is no longer possible. On the other hand, stimulation by cathodal current is possible at both the intact tip and the cut end. Electrical stimulation is even possible through the shaft of the intact hair, although considerably higher voltages than normal are required. By contrast, recording of action potentials is possible only through the tip or cut end. The shaft is a nearly perfect insulator at the voltage level represented by action potentials. These findings support the idea that the tip owes its sensitivity not only to its high degree of permeability but to special physiological characteristics. It is probable that a highly specific interaction between sugar molecules and receptor molecules is restricted to this site and that depolarization is initiated here. Whether the propagated action potential originates at this point or originates in the region of the cell body following a catelectronic spread from the tip is being investigated.

By making certain assumptions, we can estimate the number of molecules which might take part in the stimulating reaction at threshold. In the limiting case the concentration gradient would be from zero at the receptor site to the test concentration at the outer surface of the enveloping membrane of the tip. This implies that during the utilization time the molecules arriving at the receptor site are chemically or otherwise altered, and that the test solution is well mixed and has a large volume in relation to the volume of the tip. Free diffusion through a surface equal in area to that of the terminal papilla is assumed, since no basis exists for making an estimate of pore size. The effective number of molecules can be found from the equation,

$$\Delta n = \frac{DactA}{x},$$

where Δn is the amount transported in moles, A is Avogadro's number ($6{\cdot}03 \times 10^{23}$), D is the diffusion coefficient ($0{\cdot}43 \times 10^{-5}$ cm^2/s at 20° C), a is the effective area ($8{\cdot}0 \times 10^{-7}$ cm^2), c is the concentration in moles/cm^3 ($1{\cdot}0 \times 10^{-10}$), t is the time in seconds (0·1), and x is the thickness of the membrane (200 Å). The values given in parentheses are for sucrose and the hair pictured on the right hand side of the Figure. 1×10^9 molecules of sucrose will diffuse to the receptor site. The assumptions are such as to make this a maximum value, but it appears obvious that the sugar receptor does not possess by many orders of magnitude the sensitivity of the olfactory receptor.

V. G. Dethier and M. L. Wolbarsht

Department of Biology, The Johns Hopkins University, Baltimore 18, Md., May 22, 1956.

Zusammenfassung

Die chemorezeptorischen Haare am Labellum von *Phormia regina* wurden im Totalpräparat mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Die Anzahl der Moleküle, die an der schwellenwertigen Stimulationsreaktion teilnehmen, wurde abgeschätzt. Es zeigte sich, dass die Empfindlichkeit des olfaktorischen Rezeptors bei weitem die Grössenordnung des Zuckerrezeptors übertrifft.

Cytologie comparée des Muridae. L'origine des Ellobii

Poursuivant notre enquête sur la cytologie comparée et l'évolution chromosomique des Muridae[1], nous avons obtenu les résultats suivants:

Sous-famille	Genre et espèce	Nombre 2*N*	Digamétie
Murinae	*Rattus concolor otteni* Kopst.	42	*X–Y*
	Rattus rattus diardi Jentink	42	*X–Y*
	R. rattus brevicaudatus H. et R.	42	*X–Y*
	Bandicota bengalensis Gr. et H.	42	*X–Y*
	B. indica setifera Hors.	42	*X–Y*
	Golunda ellioti Gray	52	*X–Y*
	Millardia meltada Gray	50	*X–Y*
Microtinae	*Phenacomys ungava* Merriam	56	*X–Y*
	Microtus (*Chilotus*) *oregoni* Bach	17 (!)	*X–O*
Gerbillinae	*Lemmus lemmus* L.	50	*X–Y*
	Meriones blackleri Th.	72	*X–Y*

Je me contenterai de souligner quelques points importants, remettant à plus tard une discussion détaillée.

Murinae. Makino[2] a compté 46 chromosomes chez un Rongeur de Formose qu'il nomme *Nesokia nemorivaga taiwanus* Tokuda, appellation qu'Ellerman et Morrison-Scott[3] placent dans la synonymie de *Bandicota indica*. La formule chromosomique de ce Rongeur lui a paru insolite en raison de l'existence de 11 paires d'éléments métacentriques dont 6 au moins sont de grande taille: en effet, chez les *Rattus* et les genres voisins, les grands autosomes sont de type acrocentrique, des *V* ne se rencontrant que parmi les constituants petits et moyens (Guénin[4]; Makino et Hsu[5]; Tjio et Levan[6]).

[1] R. Matthey, *Les chromosomes des Vertébrés* (Ed. Rouge, Lausanne 1949); Rev. suisse Zool. *1953*, 60; Caryologia *1954*, 6; Rev. suisse Zool. *1955*, 62; Chromosoma *1956*, 7.

[2] S. Makino, Cytologia *1944*, 13.

[3] J. R. Ellerman et T. C. S. Morrison-Scott, *Checklist of palaearctic and indian Mammals* (Ed. British Museum, London 1951).

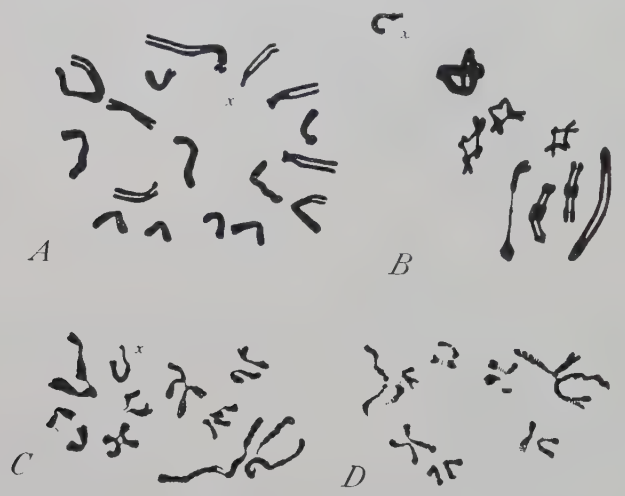
[4] H. A. Guénin, J. Genet. *1948*, 49.

[5] S. Makino et T. C. Hsu, Cytologia *1954*, 19.

[6] J. H. Tjio et A. Levan, Hereditas *1956*, 42.

Mes exemplaires de *B. indica* proviennent de Java et possèdent 42 chromosomes (et non 46) tout en étant dotés de 10 à 12 paires de métacentriques, comme ceux de Makino. Ce qui est fort curieux, c'est que l'espèce voisine, *B. bengalensis*, montre une formule chromosomique entièrement comparable à celle du Rat, c'est à dire que les grands éléments métacentriques font défaut, le nombre diploïde demeurant de 42.

Gerbillinae. Le genre *Meriones* offre des difficultés d'étude extraordinaire au systématicien, en raison du grand nombre d'espèces morphologiquement peu tranchées. L'analyse chromosomique permet maintenant de distinguer, outre les formes à 44 et à 60 chromosomes précédemment décrites, un groupe d'espèces à 72 chromosomes et dont *M. blackleri* est le premier représentant décrit.



Microtus (*Chilotus*) *oregoni*

A Métaphase spermatogoniale. *B* Métaphase auxocytaire. *C* et *D* Métaphases II à 9 (avec l'*X*) et à 8 (sans *X*) éléments. × 1800.

Microtinae. J'ai montré combien les Microtinae représentaient un matériel favorable en raison de deux faits: *a*) le groupe a été étudié avec le plus grand soin par les systématiciens; *b*) les formules chromosomiques sont des plus différentes, non seulement entre genres distincts, mais encore entre espèces d'une même genre. Nous avons pu ainsi nous livrer à la prospection systématique des formes considérées comme primitives par la taxonomie, ce qui nous permet d'assurer que, dans beaucoup de cas, il y a un parallélisme étroit entre évolution morphologique et évolution chromosomique. Comme tous les genres considérés comme primitifs ont des formules chromosomiques très voisines, il est possible d'admettre que les processus évolutifs ont été peu actifs aux deux niveaux considérés. C'est ainsi, qu'ayant, à la suite de l'étude des *Dolomys*, des *Clethrionomys*, de certains *Microtus* et des *Ondatras* (Matthey[7]) fixé à 56 ou 54 éléments acrocentriques l'équipement primitif des *Microti*, j'ai eu la satisfaction de constater que *Phenacomys ungava*, conformément à mes prévisions, était doté de 56 chromosomes acrocentriques.

Un large hiatus subsistait entre *Microti* et *Ellobii*: *Ellobius lutescens* a 17 chromosomes dans les deux sexes, ce qui implique un mode tout à fait spécial et d'ailleurs encore obscur, de la détermination sexuelle (Matthey[8]). D'autre part, son nombre fondamental (= nombre de bras), inférieur à 30, ne correspond nullement au *N.F.* des Microti (54–62) où seul *Microtus montanus* s'écarte de ces normes ($2N = 24$, *N.F.* = 44; Matthey[8]).

Or, chez *Microtus oregoni*, pour qui Baird, dès 1858, avait proposé la création d'un genre spécial, *Chilotus*, reconnu valable par Hinton[1], puis tombé au rang de sous-genre et enfin éliminé par les systématiciens contemporains, il existe 17 chromosomes et une digamétie mâle de type *X–O* (Fig.). Le génome de *Chilotus* comprend 7 métacentriques, 1 acrocentrique plus le chromosome sexuel à centromère subterminal. Ce génome est assez différent de celui d'*Ellobius* où seuls un couple d'autosomes et l'*X* sont typiquement métacentriques, les autres éléments tendant à l'acrocentrie avec leurs bras très inégaux.

Les *Ellobii* représentant un type fouisseur extrême et les *Chilotus* des Campagnols «more fossorial» (Hinton[9]) que les autres *Microtus*, une coïncidence est exclue qui exigerait la rencontre simultanée et fortuite d'une adaptation morphologique de même direction, d'un nombre diploïde extraordinairement anormal et d'un mécanisme hétérochromosomique probablement unique chez les Euthériens. Rappelons à ce propos qu'une digamétie de type *X–O* n'est connue chez aucun mammifère, le cas de *Microtus montebelli* (Oguma[10]) demandant à être revu (Matthey[11]). Cependant, étant donné que, chez *Ellobius*, le nombre de chromosomes est impair dans les deux sexes, il convient d'attendre encore d'avoir étudié des femelles de *Chilotus* avant d'affirmer qu'à l'*X–O* du mâle correspondent effectivement deux *X*.

Si tel est le cas, nous aurons l'indication très forte que le mécanisme aberrant d'*Ellobius* dérive de l'*X–Y* habituel par l'intermédiaire du schéma *X–O*. Si, par contre, *Chilotus* présentait un nombre chromosomique impair chez la femelle comme chez le mâle, il y aurait là une preuve supplémentaire de son étroite parenté avec *Ellobius*. Il est permis de reconnaître la validité du genre *Chilotus* et de considérer les Campagnols de ce genre comme de véritables «missing-links» entre les *Microti* et les *Ellobii*.

R. Matthey

Laboratoire de Zoologie, Université de Lausanne[12], *le 5 juillet 1956.*

Summary

(1) The present paper deals with the chromosomial cytology of 11 species and underspecies of *Muridae*. (2) The diploïd number being the same ($2N = 42$), there are striking differences between two species of *Bandicota*, *B. indica* showing about 20 big metacentric chromosomes which are lacking *B. bengalensis*. (3) *Meriones blackleri* is characterized by 72 chromosomes, the species previously described possessing either 44 or 60 elements. (4) The study of *Phenacomys ungava* confirms the view that 56 (54) is the primitive number in the *Microti*. There is an interesting parallelism between the morphological and the cytological data. (5) A missing link between *Microti* and *Ellobii* has been found in *Microtus oregoni* which possesses 17 chromosomes, its digamety belonging to the type *X–O*, *X–X*. (6) Owing to the fact that *M. oregoni* is more fossorial than the other *Microtus*, it is a morphological intermediate between *Microti* and *Ellobii*. (7) The genus *Chilotus* (Baird) is also fully valid.

[7] R. Matthey, Chromosoma *1956*, 7.
[8] R. Matthey, Caryologia *1954*, 6.
[9] M. A. C. Hinton, *Monograph of the Voles and Lemmings* (Ed. British Museum, London 1926).
[10] K. Oguma, Cytologia, Fujii Jub. Vol. (1937).
[11] R. Matthey, *Les chromosomes des Vertébrés* (Ed. Rouge, Lausanne 1949).
[12] Travail subventionné par le Fonds National de la Recherche scientifique.

Recombination Rates of Substituted Phenylglyoxylate Ions with Hydronium and Deuteronium Ions

In a recent communication[1] the recombination rates of the phenylglyoxylate ion with hydronium ions, water and boric acid were determined in alkaline solution[2]. For this medium the equation for fully rate-controlled currents[3] was applicable.

We wish now to report the comparison* of these data with measurements in neutral solution which were interpreted using equations developed for a case in which diffusion limits the current jointly with reaction rate. An approximate expression for joint diffusion and rate control was first derived by WIESNER[4] by introduction of the expression

$$\mu = \sqrt{\frac{1}{2}}\sqrt{\frac{D}{k'}}$$

into the expression of BRDIČKA and WIESNER[5].

$$\frac{i_k}{i_\infty} = \frac{\mu k\,[H^+]}{\mu k\,[H^+] + \varkappa\, 10^3/nF\bar{q}} \qquad (1)$$

where μ = effective thickness of the interface; D = diffusion coefficient; k' = pseudo-unimolecular rate constant of dissociation reaction; k = rate constant of recombination reaction; $\bar{q}$ = average surface area/drop of mercury; i_k = kinetic current; t = drop time; K = dissociation constant of the reducible acid; $\varkappa$ = Ilkovic constant (for definition see footnote 2); $i_\infty = i_k$ for $k = \infty$.

This resulted in equation

$$\frac{i_k}{i_\infty} = \frac{0{\cdot}57\sqrt{\frac{kt}{K}}\,[H^+]}{1 + 0{\cdot}57\sqrt{\frac{kt}{K}}\,[H^+]} \qquad (2)$$

Recently KOUTECKY[6] in a brilliant mathematical paper has solved the system rigorously and has shown that the solution expressed as a table of values is sufficiently approximated by the expression

$$\frac{i_k}{i_\infty} = \frac{0{\cdot}87\sqrt{\frac{kt}{K}}\,[H^+]}{1 + 0{\cdot}87\sqrt{\frac{kt}{K}}\,[H^+]} \qquad (3)$$

which is identical with (2) except for the absolute value of the coefficient.

In this paper the asymptotic equation (3) will be used throughout.

The recalculation of our previous results[1] for the pK of phenylglyoxylic acid = 1·39 gives

$$k_{(H_3O^+)} = 3{\cdot}9 \times 10^{11}\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}$$
$$k_{(H_2O)}\ H_2O = 150\ s^{-1}$$
$$k_{(H_3BO_3)} = 4{\cdot}41 \times 10^3\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}$$

From the present data in neutral solution (Table) under the assumption that hydronium ions are the only important proton donors in neutral solution, $k_{(H_3O^+)}$ has been calculated to be $3{\cdot}58 \times 10^{11}\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}$. The recalculation of data on phenylglyoxylic acid of KOUTECKÝ and BRDIČKA[7] using equation (3), $pK = 1{\cdot}39$ and introducing $f_{(H^+)} = 0{\cdot}80$ gave $k_{(H_3O^+)} = 4{\cdot}77 \times 10^{11}\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}$.

The value determined in the meantime by HANS and HENKE[8] is $4 \times 10^{11}\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}$.

These three different values show not only the measure of accuracy but also show that the $k_{(H_3O^+)}$ as determined in strongly alkaline solution is identical within experimental errors with this constant determined in neutral solution.

We have made measurements with phenylglyoxylic acid in heavy water (99·1% D_2O) under the same conditions as in ordinary water and found $k_{(D_3O^+)} = 7{\cdot}65 \times 10^{10}\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}$. The ratio of the rates in H_2O and D_2O was

$$\frac{k_{(H_3O^+)}}{k_{(D_3O^+)}} = 4{\cdot}7.$$

A series of substituted phenylglyoxylic acids was prepared and the recombination velocity constant of each was determined (see Table).

From the data it is possible to calculate HAMMETT's σ and ϱ constants for the *para*-methoxy and *para*-methyl substituted acids.

The substituent constant $\sigma = \log K_i - \log K_i^\circ$ [9].

Where k_i = ionisation constant of substituted acid; k_i° = ionisation constant of unsubstituted acid = $pK^\circ - pK$.

Then, $\sigma\ p\text{-}OCH_3 = -0{\cdot}26$ and $\sigma\ p\text{-}CH_3 = -0{\cdot}13$.

The average values quoted by HAMMETT[9] are

$$\sigma_{p\text{-}OCH_3} = -0{\cdot}27 \text{ and } \sigma_{p\text{-}CH_3} = -0{\cdot}17.$$

The reaction constant ϱ can be calculated also using the HAMMETT equation[9].

$$\log k - \log k^\circ = \sigma\varrho.$$

Where k = reaction constant for substituted acid; k° = reaction constant for unsubstituted acid.

* By an error in our paper [K. WIESNER, M. WHEATLEY, and J. M. LOS, J. Amer. chem. Soc. *76*, 4858 (1954)] the computed pK of phenylglyoxylic acid was reported as 2·3 instead of 1·3. While this does not change any of the conclusions of this publication, it changes the absolute values of $k_{H_3O^+}$, k_{H_2O} and $k_{H_3BO_3}$. A new determination of the pK has now given the value 1·39. This is the value for which the results of our measurements in alkaline solution were recalculated and are given in the text for comparison with the present results.

[1] K. WIESNER, M. WHEATLEY, and J. M. LOS, J. Amer. chem. Soc. *76*, 4858 (1954).

[2] For a general reference on theoretical polarography see: I. M. KOLTHOFF, *Polarography* Vol. 1. 2nd ed. (Interscience Publishers Inc., 2505th Ave., New York 1, N. Y.).

For information on the theory of determination of extremely rapid reaction rates from polarographic kinetic waves see: R. BRDIČKA, *Die Kinetik der Elektrodenvorgänge in der Polarographie. – Proceedings of the 1st International polarographic congress in Prague.* Part. III (Přírodevědecké Vydavatelství 1951), p. 332. – K. WIESNER, *Concept of Polarographic Currents Limited by Rate of a Chemical Reaction and Some of Its Applications*), Analyt. Chem. *27*, 1712 (1955). – P. DELAHAY, *New Instrumental Methods in electrochemistry* (Interscience Publishers, New York, 1954).

[3] K. WIESNER, Chem. Listy *41*, 6 (1947). – J. KOUTECKÝ and R. BRDIČKA, Coll. Czech. chem. Communic. *12*, 337 (1947).

[4] K. WIESNER, Chem. Listy *41*, 6 (1947).

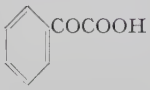
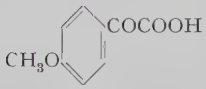
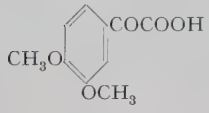
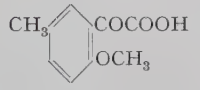
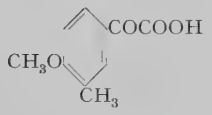
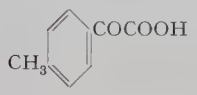
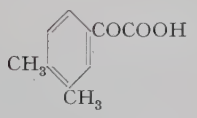
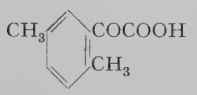
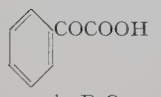
[5] R. BRDIČKA and K. WIESNER, Chem. Listy *40*, 66 (1946).

[6] J. KOUTECKÝ, Coll. Czech. chem. Communic. *18*, 597 (1953).

[7] J. KOUTECKÝ and R. BRDIČKA, Coll. Czech. chem. Communic. *12*, 337 (1947).

[8] W. HANS and K. H. HENKE, Z. Elektrochem. *57*, 595 (1953).

[9] L. P. HAMMETT, *Physical Organic Chemistry* (McGraw Hill, London and New York 1940), p. 186.

Acid	Dissociation Constant K	pK	Polarographic pK	Recombination k mol^{-1} s^{-1}	Droptime t s	Dissociation k' $1'$ mol^{-1} s^{-1}
	$4{\cdot}07 \times 10^{-2}$	1·39	6·81	$3{\cdot}58 \times 10^{11}$	4·1	$1{\cdot}46 \times 10^{10}$
	$2{\cdot}25 \times 10^{-2}$	1·65	6·78	$1{\cdot}24 \times 10^{11}$	3·5	$2{\cdot}77 \times 10^{9}$
	$1{\cdot}63 \times 10^{-2}$	1·79	7·52	$4{\cdot}13 \times 10^{12}$	3·64	$6{\cdot}70 \times 10^{10}$
	$2{\cdot}4 \times 10^{-2}$	1·62	6·92	$4{\cdot}42 \times 10^{11}$	3·64	$1{\cdot}06 \times 10^{10}$
	$1{\cdot}66 \times 10^{-2}$	1·78	7·05	$4{\cdot}85 \times 10^{11}$	3·64	$8{\cdot}06 \times 10^{9}$
	$3{\cdot}0 \times 10^{-2}$	1·52	6·80	$2{\cdot}79 \times 10^{11}$	3·64	$8{\cdot}44 \times 10^{9}$
	$4{\cdot}4 \times 10^{-2}$	1·36	6·96	$8{\cdot}44 \times 10^{11}$	3·64	$3{\cdot}68 \times 10^{10}$
	$3{\cdot}55 \times 10^{-2}$	1·45	7·26	$2{\cdot}73 \times 10^{12}$	3·64	$9{\cdot}68 \times 10^{10}$
 in D_2O	$1{\cdot}59 \times 10^{-2}$	1·79	6·69	$7{\cdot}65 \times 10^{10}$	4·40	$1{\cdot}24 \times 10^{9}$

Plotting log k against σ for the para-substituted acids and for the unsubstituted acid we obtain a straight line the gradient of which gives $\varrho = 1{\cdot}43$.

Mary S. Wheatley

Chemistry Laboratory, University of New Brunswick, Fredericton, N. B., March 19, 1956.

Zusammenfassung

Die Rekombinationsgeschwindigkeit von Phenylglyoxylationen und Hydroniumionen wird aufs neue in neutraler Lösung bestimmt, und es wird gezeigt, dass sie dem Wert, der von uns früher in alkalischer Lösung gefunden wurde, entspricht. Beide Werte stimmen auch mit den Literaturangaben überein.

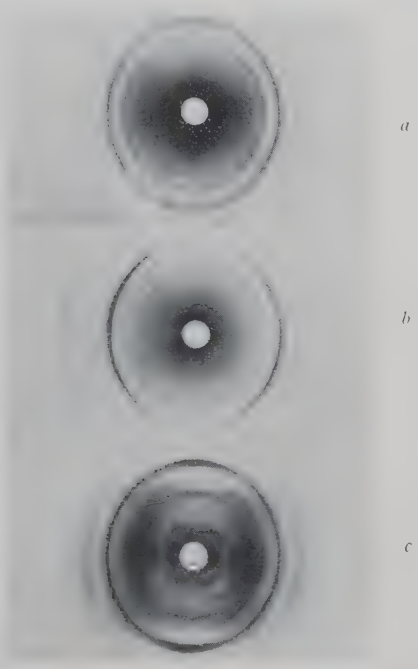
Die Rekombinationsgeschwindigkeiten einer Serie von substituierten Phenylglyoxylsäuren und die Rekombinationsgeschwindigkeit von Phenylglyoxylat- und Deuteroniumionen werden angegeben.

In Vitro Calcification of Collagen

We have found that under suitable conditions it is possible to obtain calcium phosphate inside collagen fibres in the form of hydroxyapatite. This was observed in the course of a series of studies undertaken in continuation of the observations on the oriented crystallization of soluble inorganic salts in collagen[1]. Several insoluble compounds like silver oxide, white lead, calcium fluoride and calcium carbonate could be crystallized inside collagen fibres by keeping them in solutions containing suitable concentrations of the required ions. Attempts were then made to precipitate calcium phosphate from Ringer solution, mixtures of mono- and disodium phosphate solutions with calcium chloride solution and small variations of these, but they were not successful. Sometimes calcium carbonate or calcium orthophosphate dihydrate crystallized in the collagen but only slightly. However, if collagen fibres are kept in a water suspension of precipitated calcium phosphate (B.D.H.) then an excellent precipitation of hydroxyapa-

[1] G. N. Ramachandran and G. K. Ambady, Exper. *11*, 343 (1955).

tite inside the collagen is obtained. It may be mentioned that the fibre was kept in the supernatant solution over the solid calcium phosphate and that the specimen was unchanged on washing with distilled water. The X-ray diffraction pattern of a typical specimen, together with the pattern given by a bone specimen, are shown in the Figure (*a*) and (*b*). The resemblance between the two is striking but for the greater sharpness of the lines observed in the synthetic specimen, showing that the particle size of the hydroxyapatite crystals is much larger.



Hendricks[2] has suggested that, in bone, carbonate and citrate ions occur essentially on the surface of the hydroxyapatite crystals and that their occurrence limits the particle size. Consequently experiments were made by (a) passing carbon dioxide continuously through the suspension of calcium phosphate and (b) adding citric acid to it. The former had practically no effect on the particle size, while the latter definitely decreased the particle size at very low concentrations. The optimum condition was obtained by adding 0·02 mg/ml of citric acid with the pH of the solution adjusted to 7·6 by addition of 10% ammonium hydroxide. The X-ray diffraction pattern of a specimen obtained with this solution is shown in the Figure (*c*) and the very close correspondence to the bone pattern is noteworthy. Thus the synthetic formation of a material very similar to bone from collagen appears to have been achieved.

A number of other observations have also been made, such as the inhibiting effect of certain ions and the relative deposition of calcium phosphate and other salts when both are present. These details will be published elsewhere in due course. This appears to be the first time that the deposition of hydroxyapatite on collagen fibres as such has been obtained. Previous studies on the calcification of cartilage have invariably been made only with collagenous tissue.

G. N. Ramachandran and M. S. Santhanam

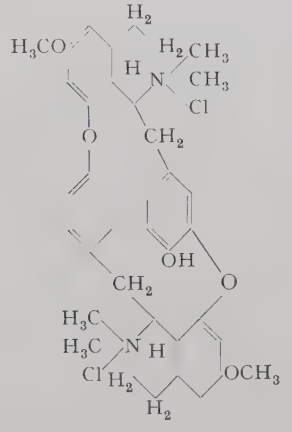
Department of Physics, University of Madras, India, June 1, 1956.

Zusammenfassung

In Collagenfasern kann durch Aufbewahren in einer wässerigen Suspension von gefälltem Kalciumphosphat eine Ablagerung von Hydroxyapatit erhalten werden. Der Niederschlag lässt sich durch Waschen mit Wasser nicht entfernen. Das Röntgenbild der Abscheidung gleicht weitgehend demjenigen des anorganischen Bestandteils der Knochen. Nach Zufügung einer Spur Zitronensäure ist auch die Teilchengrösse von derselben Ordnung wie im Knochen.

Wirkung von δ-Tubocurarinchlorid auf den O_2-Verbrauch der Eier von *Psammechinus microtuberculatus*

Es wurde der Einfluss von δ-Tubocurarinchlorid (dTC)[1] auf den Stoffwechsel von Seeigeleiern studiert.



δ-Tubocurarinchlorid

Die Untersuchungen wurden im Mai 1956 in Neapel an befruchteten und unbefruchteten Eiern von *Psammechinus microtuberculatus* durchgeführt. Anwendung fand die direkte Messmethode nach Warburg mit CO_2-Absorption durch 12prozentige KOH: im Atmungsraum 3 cm^3 5% Eisuspension in Golfwasser, Versuchstemperatur 21°, Schüttelgeschwindigkeit 90 Einzelschläge min^{-1}, Exkursion 5 cm, Gasphase Luft, Bestimmung der Stoffwechselgrössen über 2–3 h in 20-Minuten-Abständen nach Umrechnung auf Grundbedingung mit der Warburgschen Formel für die Gefässkonstante und graphische Darstellung der Q_{O_2}-Einzelwerte in einem Koordinatensystem nach der Zeit.

Die Untersuchungen haben ergeben, dass dTC in Konzentrationen über 1,2 mg% den O_2-Verbrauch von Seeigeleiern signifikant senkt. Dieser Effekt lässt sich sowohl an befruchteten als auch an unbefruchteten

[2] S. B. Hendricks and W. L. Hill, *Metabolic Interrelations*, Transactions of the Third Conference of Macy Foundation (New York 1951), p. 173.

[1] H. King und K. Folkers, Science *97*, 467 (1943).

Eiern nachweisen. An befruchteten Eiern ist das Ausmass der Abnahme des O_2-Verbrauchs grösser. dTC besitzt demnach neben seiner bekannten elektiven Wirkung auf die Endplatten der motorischen Nerven[2] auch

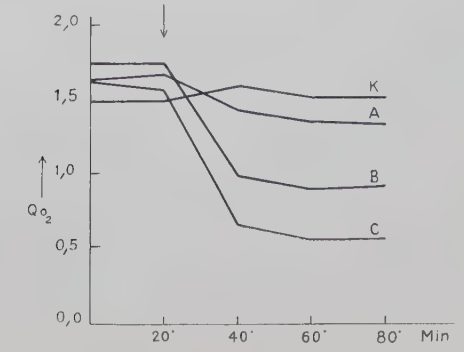


Abb. 1. O_2-Verbrauch der unbefruchteten Eier von *Psammechinus microtuberculatus* nach der Einwirkung von dTC. *K* Kontrolle; *A* 1,2 mg% dTC; *B* 5 mg% dTC; *C* 7,5 mg% dTC. Versuch bei 21°; Einkippen der Pharmakalösung bei ↓.

eine direkte Wirkung auf die Einzelzelle. Prostigmin bzw. Mestinon, welche die Curarewirkung an der motorischen Endplatte bekanntlich aufheben[3], vermögen die durch dTC hervorgerufene Senkung des O_2-Verbrauchs nicht zu antagonisieren.

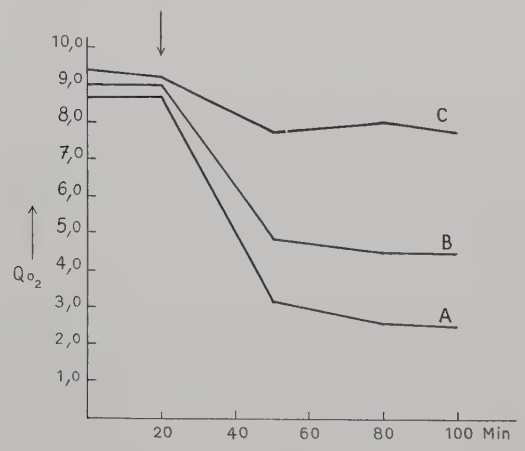


Abb. 2. O_2-Verbrauch der befruchteten Eier von *Psammechinus microtuberculatus* nach dTC. *A* 7,5 mg%; *B* 5 mg%; *C* 1 mg%. Versuch bei 21°.

Vitalfärbeversuche mit Neutralrot deuten darauf hin, dass die durch dTC hervorgerufene Senkung des O_2-Verbrauches durch eine Verminderung der Grenzflächendurchlässigkeit hervorgerufen wird. Ausführliche Darstellung und Diskussion der Ergebnisse an anderer Stelle[4].

[2] Cl. Bernard und T.-J. Pelouze, C. r. Acad. Sci. *31*, 533 (1850). – A. Kölliker, C. r. Acad. Sci. *43*, 824 (1856). – G. Coppée, Arch. int. Physiol. *53*, 327 (1943).

[3] R. Boehm, *Heffters Handbuch* II/1, S. 183. – A. R. McIntire, *Curare* (The University of Chicago Press, Chicago-Illinois 1947). – H. Hofmann, Pharmazie *1948*, 485.

[4] H. Hofmann und E. Hofmann, Wiss. Z. Friedr.-Schiller-Univ. Jena, Juni 1956 (im Druck).

δ-Tubocurarinchlorid wurde uns freundlicherweise von der Firma Chemische Fabrik Asta (Brackwede), Prostigmin und Mestinon von der Firma Hoffmann La-Roche (Grenzach) zur Verfügung gestellt.

H. und E. Hofmann

Institut für Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und Zoologische Station Neapel, den 1. Juni 1956.

Summary

δ-Tubocurarinchloride is shown to inhibit the respiration of sea-urchin eggs *in vitro* in concentrations up to 1·2 mg%. This effect is not inhibited by Prostigmin or Mestinon.

Quantitative Paper Chromatography of Lipids[1]

Paper chromatographic separations of lipids have been carried out mostly by using reversed phase methods with hydrocarbons as the stationary and polar solvents (methanol, acetic acid, water) as the mobile phase[2]. The commonly used indicators for staining have been Rhodamin B, copper acetate combined with potassium ferrous cyanide[3], or similar compounds which are restricted essentially to the detection of lipids having a free carboxyl group. Indicator methods independent of functional groups have been devised for unsaturated esters by chromatographing their mercuric acetate complexes[4] and detecting them with diphenylcarbazone which forms a colored spot with the mercury compound. All lipids chromatographed on glass fiber paper can be located by charring with sulfuric acid[5]. Use of paper chromatography for the quantitative determination of lipids has been reported only for one of these methods[6] and has been limited to the determination of acids.

Recently Mangold, Lamp and Schlenk[7] have described the chromatography of lipids on siliconized paper as the stationary phase with aqueous acetic acid as the mobile phase. This system separates lipids consisting essentially of one long-chain moiety (acids, esters, aldehydes, alcohols, monoglycerides) while a chloroform-methanol mixture can be used to separate the triglycerides. Two indicators cover the whole variety of compounds, regardless of their functional groups. Iodine vapors react with any lipid having double bonds to yield yellowish-brown spots on a light background. Saturated lipids can be detected by means of α-cyclodextrin (cyclohexaamylose) and subsequent iodine treat-

[1] This work has been supported by a research grant from the National Institutes of Health (P. H. S. 4226) and by the Hormel Foundation. Hormel Institute publication No. 143.

[2] J. Boldingh, Exper. *4*, 270 (1948). – J. Inouye and M. Noda, J. agric. chem. Soc. Japan *26*, 634 (1952).

[3] H. P. Kaufmann and W. H. Nitsch, Fette, Seifen, Anstrichmittel *56*, 154 (1954).

[4] I. Inouye, M. Noda, and O. Hirayama, J. Amer. Oil Chem. Soc. *32*, 132 (1955).

[5] J. W. Dieckert and R. Reiser, J. Amer. Oil Chem. Soc. *33*, 123 (1956).

[6] H. Wagner, L. Abisch, and K. Bernhard, Helv. chim. Acta *38*, 1536 (1955).

[7] H. K. Mangold, B. G. Lamp, and H. Schlenk, J. Amer. chem. Soc. *77*, 6070 (1955).

ment, as long as the lipid undergoes the inclusion reaction with α-cyclodextrin. The inclusion complexes can be formed on the paper after development of the lipid chromatogram by spraying it with α-cyclodextrin. When reacted with the lipid, α-cyclodextrin is inert to iodine vapors, while in free form it yields a purplish color instantaneously with iodine. Accordingly the lipids are detected as white spots on a purple background. Saturated di- and triglycerides do not react with cyclohexaamylose and cannot be located by this simple device.

	Analysis 1	Analysis 2	Analysis 3
	Acids %	Methyl esters %	Monoacid triglycerides %
Stearic	–	9·3 (10·0)	–
Oleic	30·7 (29·3)	27·5 (26·2)	20·3 (19·2)
Linoleic	23·2 (24·0)	33·4 (31·5)	46·5 (47·0)
Linolenic	46·5 (46·8)	29·8 (32·3)	35·4 (33·9)

These methods are applicable to the quantitative determination of lipids. Mixtures of fatty acids of the C_{18} series, of their methyl esters, or of the unsaturated mono-acid triglycerides have been analyzed by paper chromatography. Some results are given in the following compilation, where the theoretical values are listed in parentheses.

The procedures were essentially the same as previously reported. Siliconized paper (Dow Corning 200 fluid on Whatman No. 1 paper) was used in ascending chromatographic technique. The chromatograms of the fatty acids or esters were developed for 16–20 h at 30° ± 1° C with a mixture of aqueous 88% formic and 85% acetic acids (1:1 by volume) while the triglycerides were separated at 24° ± 1° C with a chloroform-methanol solvent mixture (3:1 by volume). A densitometer was used for measuring the optical densities of brown spots in blue light (filter 445 mμ) and for measuring the transmission of white spots on purple background in green light (filter 525 mμ). Model mixtures of known composition were chromatographed with an unknown on the same sheet, and the areas of the optical absorption curves were compared. After one or two adjustments of the component ratios in the model blends, linear interpolation is permissible for calculating the composition of the unknown.

The direct determination of oleic and stearic acids or their esters, which so far is possible only by paper chromatography, will often be advantageous. Higher unsaturated acids are commonly determined by alkaline isomerization. Notwithstanding merits of this latter method, the smaller amounts required for paper chromatography will make this technique very useful in many cases. To our knowledge, no method for the paper chromatographic separation and assay of triglycerides has been reported previously.

A more detailed report will appear in the near future.

Joanne L. Gellerman and Hermann Schlenk

Hormel Institute, University of Minnesota, Austin, Minn., May 24, 1956.

Zusammenfassung

Ein qualitatives Verfahren zur papierchromatographischen Trennung von Fettsäuren und Derivaten liess sich zur quantitativen Bestimmung ausbauen. Die Methode hat eine Fehlergrenze von etwa ± 5% und ist unabhängig von den funktionellen Gruppen der Moleküle. Sie ist für gesättigte Di- und Triglyceride nicht direkt anwendbar.

The Influence of Albumin on the Electrophoretic Mobility of Serum Lipids*

Maurer[1] reported in 1953 that the addition of serum or albumin to the buffer profoundly altered the distribution of phospholipids in paper electropherograms of rat and rabbit sera doubly labelled with S^{35} and P^{32}. While he found almost all of the phospholipids associated with the serum globulins before addition of the "carrier protein", albumin appeared to form a complex with the phospholipids which migrated with the electrophoretic mobility of an albumin.

Maurer's experiments imply that the molecular structure of the lipoprotein complexes, which have been shown to contain most of the serum phospholipids and cholesterol[2] must be based on only very weak associations between the protein and lipid moieties, since albumin appeared to displace the protein component by a simple mass action effect. Such a dependence of lipoprotein structure upon the protein composition of the medium would invalidate much of the work of Gofman and Page on the determination of lipoprotein subfractions since these ultracentrifugal analyses were carried out in protein-poor solutions. While lipoproteins have long been considered labile structures and have been shown to exchange component lipids even *in vitro*[3] there is some evidence which argues against Maurer's views: It would be very difficult to explain the differences in solubility and electrophoretic mobility between α- and β-lipoproteins within the framework of Maurer's postulate. Moreover, Ruhenstroth-Bauer[4] has demonstrated recently that the protein moiety of human serum lipoproteins is specific and cannot be replaced by either albumin or γ-globulin. In order to resolve this controversy we have reinvestigated the effect of added albumin on the electrophoretic mobility of serum phospholipid and cholesterol in human, hypercholesterolemic rabbit, and hypercholesterolemic rat sera. The effect upon phospholipid mobility alone was determined in normal rat and rabbit sera, where low cholesterol levels made analysis for this compound impractical.

In all experiments the sera were labelled biologically by administering radiophosphorus** to the donor 48 h before bleeding. Hypercholesterolemia was induced in rabbits by feeding a diet enriched with 1% cholesterol and 5% corn oil for 14 weeks, and in rats by the intra-

* Supported in part by a grant (H–2013) from the National Heart Institute, U.S. Public Health Service.

[1] W. Maurer, Klin. Wschr. *30*, 323 (1952). – W. Maurer and E. R. Muller, Biochem. Z. *324*, 255 (1953). – W. Maurer, Arch. exper. Path. Pharmakol. *218*, 26 (1953).

[2] *Cf.* J. L. Oncley and F. R. N. Gurd, in: J. L. Tullis, *Blood Cells and Plasma Proteins* (Academic Press, New York, 1953), p. 337.

[3] H. G. Kunkel and H. G. Bearn, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *86*, 887 (1954). – W. H. Florsheim and M. E. Morton, unpublished results.

[4] G. Ruhenstroth-Bauer, Z. ges. exper. Med. *121*, 475 (1953).

** The Radioisotopes used in this investigation were supplied by the Oak Ridge National Laboratory on authorization from the Isotopes Division, U. S. Atomic Energy Commission.

venous injection of 100 mg "Triton WR-1339"***. Electrophoresis was carried out in barbital buffer of pH 8·8 and ionic strength 0·1 by the "Starch Block" or "Paper Sandwich" techniques of Kunkel and Slater[5]. The separation of the α-lipoproteins was better by the "Starch Block" technique since lipoproteins appear to be adsorbed less on starch than on paper. With rat sera, especially, good separations could not be obtained by paper electrophoresis. 1 or 2 cm³ of serum were used for each experiment. Human serum albumin, when employed, was added to the barbital buffer to a concentration of 2·50 g%. When albumin was present in the buffer

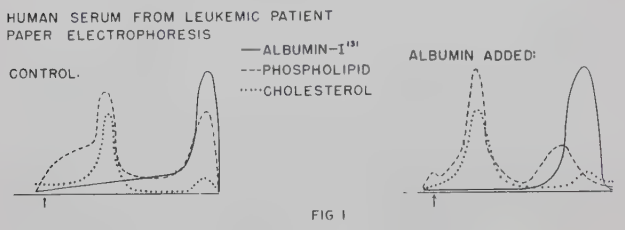


FIG 1

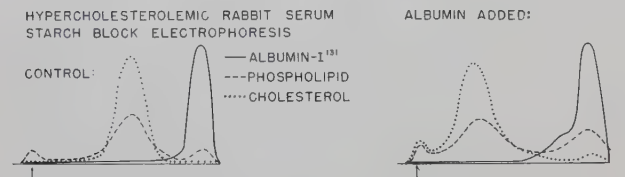


FIG 2

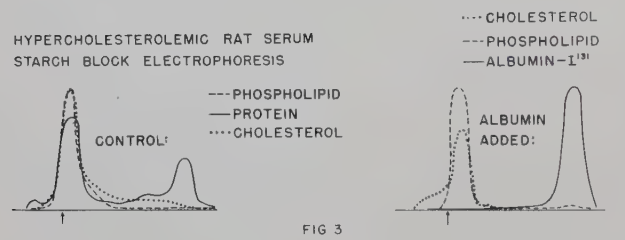


FIG 3

the position of the albumins in the experimental serum was marked by adding tracer amounts of I^{131}-labelled human serum albumin[6], which was shown to be a satisfactory marker for the animal albumins also. Electrophoretic separation was carried out for 24–38 h at room temperature with a potential of 300 V and a current of 10 mA. The electropherograms were cut into 1 cm segments and protein was measured in saline eluates by the Biuret reaction. Cholesterol was determined by the methods of Zlatkis[7] on aliquots of a Bloor extract. Albumin-I^{131} was assayed with a scintillation counter using a thallium-activated sodium iodide crystal, and radiophosphorus was determined by Geiger counting of a protein-free lipid extract.

Figures 1 to 3 show the results of typical experiments. Our results differ from Maurer's on two crucial points:

We were able to demonstrate both α- and β-lipoprotein peaks, but could not detect any albumin-induced shift of either lipid phosphorus or cholesterol from the β-globulin to the albumin region of the electropherograms.

Several possible explanations of these differences can be postulated. In our work much larger volumes of serum were employed, and this tends to minimize adsorption effects[8]. Lipoprotein denaturation appears likely in Maurer's experiments, judging from the large amounts of lipid phosphorus remaining near the origin and from diffuse distribution of the phospholipids migrating in the absence of added albumin. We established that albumin is capable of binding lipids by adding the lipids from deproteinized human lipoproteins to rat serum. Adding albumin to the buffer doubled the amount of extraneous lipids which migrated in electrophoresis with the rat proteins. Armstrong[9] has noted that partial denaturation may increase the electrophoretic mobility of human lipoproteins considerably, which may explain the abnormally high electrophoretic mobility of "lipoproteins" observed by Maurer[10] after the addition of human α- and β-globulin. Denaturation also appears indicated by the fact that Maurer was unable to demonstrate two lipoprotein peaks in rabbit sera. The data of Lewis[11] show that at least a third of the total lipids is carried as a β-lipoprotein in this species. We believe that under the conditions employed by Maurer an almost complete denaturation of lipoproteins occurred, and that the conclusions drawn by Maurer regarding the nature of protein-lipid binding in serum lipoproteins are therefore not sufficiently substantiated.

W. Florsheim, B. Dimick, and M. E. Morton

Radioisotope Service, Veterans Administration Hospital, Long Beach, California, and Department of Physiological Chemistry, University of California Medical School, Los Angeles 24, California, June 4, 1956.

Zusammenfassung

Im Gegensatz zu Maurers Angaben konnte keine Wirkung des dem Puffer zugegebenen Serum-Albumins auf die elektrophoretische Wanderung von Serumphospholipiden und Cholesterin im menschlichen und tierischen Serum festgestellt werden. Maurers Befunde scheinen auf einer durch Adsorptionseffekte bewirkten Veränderung der Lipoproteine zu beruhen.

*** Rohm & Haas Co., Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.

[5] H. G. Kunkel and R. J. Slater, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *80*, 42 (1952).

[6] R. C. Gilmore, M. C. Robbins, and A. F. Reid, Nucleonics *12*, 65 (1954).

[7] A. Zlatkis, B. Zak, and A. J. Boyle, J. Lab. clin. Med. *41*, 486 (1953).

[8] A. Mariani. R. C. Ist. sup. Sanità *15*, 337 (1952).

[9] S. H. Armstrong Jr., M. J. E. Budka, and K. C. Morrison, J. Amer. chem. Soc. *69*, 416 (1947).

[10] W. Maurer and E. R. Muller, Biochem. Z. *324*, 255 (1953).

[11] L. A. Lewis, A. A. Green, and I. H. Page, Amer. J. Physiol. *171*, 391 (1952).

Hypertension expérimentale et protéines sériques

Différents groupes d'auteurs (Bouchnut, Froment et Grasset[1], Page et Corcoran[2], Raaschou[3], Loyke[4])

[1] L. Bouchnut, R. Froment et E. Grasset, Lyon méd. *160*, 3 (1937).

[2] I. Page and A. Corcoran, Ann. Rev. Med. *2*, 51 (1951).

[3] F. Raaschou, Circulation *10*, 511 (1954).

[4] H. Loyke, Amer. J. med. Sci. *230*, 627 (1955).

ont observés que les patients atteints de cirrhose hépatique ne souffraient que très rarement d'hypertension essentielle. Si la cirrhose guérit et que les protéines sériques se normalisent (exprimées par le quotient A/G), une hypertension essentielle peut alors se manifester. Par contre la cirrhose n'influerait pas l'hypertension néphrogène.

Les travaux de HANDLER et BERNHEIM[5] ont montré qu'un rat rendu hypertendu par ischémie rénale redevenait normotendu s'il était soumis à un régime sans choline.

On sait que l'ischémie rénale aiguë produit une hypertension par le mécanisme suivant: La rénine libérée par l'ischémie rénale aiguë active l'hypertensinogène fournie par la fraction globulinique α_2 et donne naissance à l'hypertensine. Ce mécanisme ne vaut que pour l'hypertension aiguë. Par nos essais nous avons voulu voir si une modification de la fraction α_2 jouait un rôle d'une part dans la genèse de l'hypertension, et d'autre part dans la normalisation de la tension artérielle par un régime sans choline.

Essais. Groupe A. Sur 15 rats mâles blancs de 200 à 220 g on procède à l'ablation d'un rein. On entoure l'autre rein d'une capsule en matière plastique. On contrôle régulièrement la tension de ces rats (méthode plethysmographique). Chez les animaux ainsi opérés on constate bientôt une hypertension qui reste constante.

La tension étant demeurée constante pendant 4 à 6 semaines, ces rats reçoivent alors un régime sans choline. La tension s'abaisse régulièrement et nos résultats corroborent ceux de HANDLER et BERNHEIM[6]. Lorsque la tension demeure définitivement basse (resp. normale) nous sacrifions ces animaux. Nous étudions la répartition des protéines sériques par l'électrophorèse sur papier.

Groupe B. 10 rats mâles de 200 à 220 g ont été opérés de la même façon que ceux du groupe *A*. Lorsque l'hypertension demeure fixe, nous tuons ces animaux et étudions la répartition des protéines sériques par l'électrophorèse sur papier.

Groupe C. Etude de la répartition des protéines sériques (électrophorèse sur papier) de 7 rats normaux.

Résultats (Tableaux I, II et III). Nous avons comparé statistiquement les résultats des 3 groupes *A*, *B* et *C*, afin de savoir s'il y a une différence significative dans la répartition des protéines sériques (Tableau IV).

Discussion. On constate entre les groupes A/C et B/C une modification significative de la fraction α_2. Par contre, il n'y a aucun écart significatif entre les globulines α_2 des groupes *A* et *B*. Quant aux autres fractions protéiniques des différents groupes, elles ne présentent pas de variations significatives.

Si nous comparons les résultats enregistrés au cours de ces essais avec ceux qui nous sont fournis par la clinique, nous voyons que les patients porteurs de lésions rénales demeurent hypertendus malgré leur cirrhose, et qu'un retour des protéines sériques à la normale peut, chez un cirrhotique, s'accompagner d'hypertension essentielle.

Or les rats du groupe *A* sont hypertendus (lésions rénales). Soumis à un régime sans choline, ils redeviennent normotendus. La répartition des globulines α_2 ne diffère pourtant pas de celle des rats hypertendus (les autres fractions sont également statistiquement semblables).

La comparaison entre les fractions α_2 des séries *B* et *C* aurait pu nous faire croire que l'augmentation des globulines α_2 jouait un rôle déterminant dans la genèse de l'hypertension, et qu'elles activaient un autre système presseur. L'étude de ces globulines α_2 des rats du groupe *A* ne nous a pas permis de confirmer cette hypothèse. Il aurait fallu enregistrer dans ce groupe une diminution de cette fraction α_2, ce qui n'est pas le cas.

Tableau I. A. Capsule périrénale + régime sans choline

	Albumine	α_1	α_2	β	γ	A/G
	36,0	13,0	10,0	28,3	12,7	0,50
	25,8	18,9	16,5	22,3	16,5	0,30
	19,2	30,6	16,3	24,2	9,7	0,22
	36,8	10,2	13,2	25,3	14,5	0,50
	25,0	16,0	24,8	21,2	13,0	0,30
	33,4	8,4	13,2	21,6	23,4	0,50
	42,0	15,9	9,6	22,0	10,5	0,70
moyenne arith. $\bar{x}$	31,17	16,14	14,80	23,56	14,33	0,431
dispersion s^2	64,59	53,66	26,72	39,36	21,25	0,37
écart standard s	8,03	7,32	5,16	6,56	4,61	0,61

Tableau II. B. Capsule périrénale

	Albumine	α_1	α_2	β	γ	A/G
	38,8	15,1	11,2	23,0	11,9	0,63
	26,2	20,9	12,1	23,4	17,4	0,36
	32,3	10,3	13,5	26,3	17,6	0,48
	35,0	15,2	10,3	25,2	14,3	0,54
	29,0	23,0	12,7	25,4	9,7	0,41
	35,8	16,1	9,8	21,8	16,5	0,55
	35,0	14,2	9,8	24,2	17,5	0,54
	29,5	18,6	8,2	30,4	13,3	0,42
moyenne arith. $\bar{x}$	32,7	16,7	10,95	24,9	14,7	0,48
dispersion s^2	17,65	18,57	3,08	8,69	10,08	0,015
écart standard s	4,20	4,83	1,75	2,94	3,17	0,12

Tableau III. C. Rats normaux

	Albumine	α_1	α_2	β	γ	A/G
	38,9	9,6	7,2	26,6	17,7	0,64
	44,6	7,9	6,6	26,8	14,1	0,81
	35,0	14,5	7,5	22,6	20,4	0,54
	36,8	16,0	9,2	21,9	16,1	0,58
	30,6	10,0	8,2	32,8	18,4	0,44
	29,4	23,8	10,0	24,7	12,1	0,42
	40,5	17,1	7,9	21,6	12,9	0,68
moyenne arith. $\bar{x}$	36,54	14,12	8,09	25,29	15,96	0,59
dispersion s^2	29,27	30,53	1,34	15,38	9,35	0,016
écart standard s	5,41	5,52	1,15	3,92	3,51	0,13

Des auteurs[7] ont démontré expérimentalement qu'il y avait dans l'hypertension un hyperaldostéronisme chronique. Nous savons que les stéroïdes sont liées aux albu-

[5] F. BERNHEIM et PH. HANDLER, Amer. J. Physiol. *162*, 375 (1950).
[6] PH. HANDLER et F. BERNHEIM, Amer. J. Physiol. *162*, 368 (1950).
[7] J. GENEST, Science *123*, 503 (1956).

Tableau IV
Signification de la différence entre les moyennes des 3 groupes

	Albumine	α_1	α_2	β	γ	A/G
A/B	$t = 0{,}326$	$t = 0{,}13$	$t = 1{,}36$	$t = 0{,}371$	$t = 0{,}128$	$t = 0{,}153$
$n = 13$	$P < 0{,}8$	$P < 0{,}9$	$P < 0{,}2$	$P < 0{,}9$	$P < 0{,}9$	$P < 0{,}9$
A/C	$t = 1{,}037$	$t = 0{,}408$	$t = 2{,}371$	$t = 0{,}462$	$t = 0{,}550$	$t = 0{,}151$
$n = 12$	$P < 0{,}4$	$P < 0{,}7$	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}7$	$P < 0{,}6$	$P < 0{,}9$
B/C	$t = 1{,}85$	$t = 0{,}713$	$t = 2{,}647$	$t = 0{,}151$	$t = 0{,}552$	$t = 1{,}22$
$n = 13$	$P < 0{,}1$	$P < 0{,}5$	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}9$	$P < 0{,}6$	$P < 0{,}3$

mines sériques[8]. Il pourrait y avoir un trouble de la liaison protéines/aldostérone lorsque la répartition des protéines est altérée.

Peut-être pourrait-on expliquer l'action de l'ACTH qui, injectée à des rats néphrectomisés, provoque une hausse transitoire de la tension artérielle (Handler et Bernheim[6]), par une décharge passagère d'aldostérone. Nous constaterons que seules les globulines α_2 sont modifiées dans nos essais et qu'en particulier le quotient A/G est inchangé dans les 3 groupes. En conclusion, nous pouvons dire que, si chez le rat hypertendu la fraction α_2 s'élève de façon significative, le retour à la normale par régime sans choline ne s'accompagne pas d'une diminution de la fraction α_2 mais que celle-ci demeure pratiquement la même que chez les rats hypertendus.

C. Jacot et H. Staub

Clinique médicale universitaire, Bâle, le 1er juin 1956.

Summary

The authors investigated the distribution of serum proteins, especially the α_2 fraction, in rats with artificially induced hypertension (*A*), in similar rats made normotone by choline-free diet (*B*), and in a control group (*C*). A rise in the α_2 fraction of group *A* and *B* was found, without a significant change of the other serum proteins.

[8] K. Eis-Nes, J. A. Schellman, R. Lumry et L. Samuels, J. biol. Chem. *206*, 411 (1954).

Differenzierungsmethode metachromatischer Zellen nach ihrem Säuregrad

Bei histochemischen Untersuchungen der Gewebsmastzellen, die zusammen mit Lennert und Borstell durchgeführt wurden, erschien es verlockend, die pH-Abhängigkeit der metachromatischen Färbbarkeit quantitativ zu erforschen. Dazu wurde folgende Methode entwickelt.

Das zu untersuchende Gewebe – in unserem Falle Knochenmark – wird nach Paraffineinbettung 4 μ dick geschnitten, sorgfältig entparaffiniert und in *Aqua dest.* gebracht. (An Stelle von Schnitten lassen sich auch Ausstriche verwenden.)

Anschliessend färben wir den Schnitt unter gleichmässigem Schwenken 5 min in einer 0,1%igen, wässerigen, gepufferten Toluidinblaulösung und differenzieren ihn 5 min in gepuffertem *Aqua destillata* der gleichen Wasserstoffionenkonzentration. Das pH der Farblösung und der Spülflüssigkeit soll so niedrig sein, dass sich eben einige metachromatische Zellen anfärben. Bei dem Fall der Mastzellen des Knochenmarkes genügt ein pH von 2,62. Als Puffer eignet sich am besten das Veronalnatrium-Azetat-Gemisch von Michaelis.

Zum Entwässern wird der Schnitt 2 min in 96%igem Äthanol und 2 min in einmal gewechseltem Isopropylalkohol hin und her geschwenkt. Nach dem Isopropylalkohol trocknen wir ihn zwischen Fliesspapier ab und decken ihn in reines Zedernholzöl ein.

Das jetzt untersuchungsfertige Präparat wird unter dem Mikroskop mit einem Kreuztisch auf eine günstige Stelle eingestellt. In einem durch den Kreuztisch genau definierten Bezirk werden bei starker Vergrösserung alle Zellen mit metachromatischen Granula ausgezählt.

Danach entfernen wir das Deckglas – durch das nicht-erhärtende Zedernöl bleibt das Präparat unbeschädigt – und wiederholen den Färbevorgang bei einem pH einer höheren Stufe. Anschliessend zählen wir wieder die gleiche Stelle bei der gleichen Vergrösserung aus. Diese Prozedur wird mit stufenweise zu erhöhendem pH so oft wiederholt, bis die Zahl metachromatisch tingierter Zellen einen Höchstwert erreicht. Er soll 200 Zellen nicht unterschreiten, um die Fehlerbreite möglichst klein zu halten. Der erzielte Höchstwert wird gleich 100% gesetzt. Die bei den niedrigeren pH gewonnenen Zahlen rechnet man in Prozentzahlen um und trägt sie mit den ihnen zugehörigen pH-Werten in ein Koordinatensystem ein.

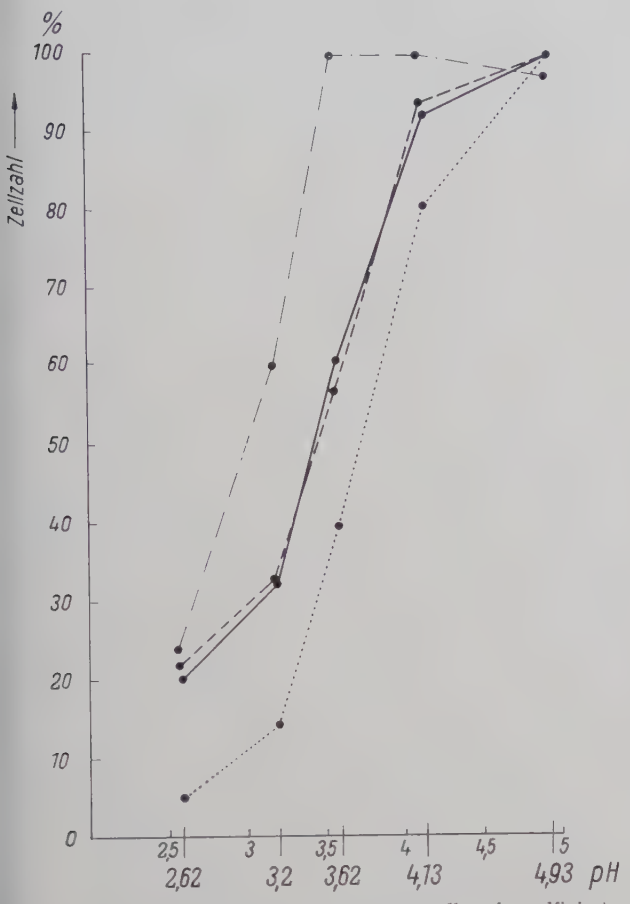
Vor dem Färbegang können wir noch Reagenzien einwirken lassen, die Beziehungen zur metachromatischen Substanz haben, zum Beispiel Hyaluronidase, Ribonuklease, Wasser, organische Lösungsmittel usw. Das Ergebnis kann dann unter Umständen die Wirkungsweise der angewandten Lösung erklären.

In der Abbildung ist an Hand einiger Beispiele die pH-abhängige Färbbarkeit der Gewebsmastzellen des menschlichen Knochenmarkes dargestellt. Es wurden dazu Fälle ausgewählt, die mit einer starken Mastzellenvermehrung einhergehen: 3 Kurven stammen von Kranken mit Morbus Waldenström (zum Teil veröffentlicht von Lennert[1]) und eine Kurve von einer Mastzellenretikulose (Lennert[2]).

Die Kurven I und II sind völlig gleich, obwohl sie von 2 verschiedenen Fällen von Morbus Waldenström stammen und unterschiedlich, nämlich in Formol bzw. Bleiazetat, fixiert sind. Die Kurve III ist von dem gleichen Fall gewonnen, der in Kurve II dargestellt ist, wurde aber nach zweistündiger Luronasebehandlung erzielt. Man sieht, dass die sauren Mukopolysaccharide von der Azidität der Hyaluronsäure nicht mehr färbbar, also

[1] K. Lennert, Frankf. Z. Pathol. *66*, 201 (1955).
[2] K. Lennert, *Europ. Hämatol. Kongress*, Freiburg 1955.

offenbar durch das Ferment herausgelöst sind. In Kurve IV, die von der Mastzellenretikulose gewonnen wurde, ist die histochemische Abartigkeit der maligne entarteten Mastzellen deutlich erkennbar.



——— I: Nicht vorbehandelte Gewebsmastzellen formolfixierten Femurmarkes von M. Waldenström.

– – – II Mit *Aqua dest.* vorbehandelte Gewebsmastzellen bleiazetatfixierten Femurmarkes von M. Waldenström.

·–·–· III Mit Luronase vorbehandelte Gewebsmastzellen bleiazetatfixierten Femurmarkes von M. Waldenström.

····· IV: Gewebsmastzellen formolfixierten Femurmarkes von Mastzellenretikulose.

(Nähere Beschreibung im Text)

Es steht zu erwarten, dass mit dieser Methode eine Reihe von Fragen, die sich auf die Natur und Funktion der Mastzellengranula richten, zu lösen ist.

J. C. F. Schubert

Pathologisches Institut der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main, den 9. Mai 1956.

Summary

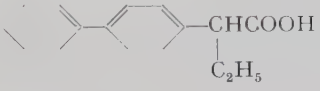
A method is described for histochemical definition of the metachromatic substance of mast cells. A slide of tissue containing mast cells is treated with substances dissolving metachromasia, such as hyaluronidase and water, and later on stained in aqueous solutions of gradually heightened pH. A marked spot of the slide is counted at each pH. Concentrations of hydrogen and numbers of mast cells result in a characteristic curve.

Diphenylilethylacetic Acid Inhibits Hypercholesteremia Induced by Triton

Aware of the great importance of Coenzyme A for *in vitro*[1] and *in vivo*[2] synthesis of cholesterol, we thought that by testing several substances showing inhibitory activity on the Co A, we could obtain drugs able to interfere with cholesterol metabolism.

For this purpose we undertook some researches in connection with the work of Cottet *et al.* on the hypocholesteremic activity of the phenylethylacetic acid[3], and with our previous results demonstrating that acetylation activity of Co A, studied according to the procedure of Kaplan and Lipmann[4], is inhibited *in vitro* by phenylethylacetic acid.

On the other hand, also *in vitro*, we have proved, on a series of molecules, that suitable substitutions of 1 or 2 atoms of hydrogen in the methyl group of acetic acid, compounds are obtained which are much more active than phenylethylacetic acid itself[5]. One of the compounds showing the highest inhibiting activity on the acetylation process, also *in vivo*[6], is diphenylilethylacetic acid[7].



As a test for evaluating the action of diphenylilethylacetic acid, hypercholesteremia and hyperlipemia have been obtained by means of an administration of Triton[8]. According to recent results, the action of Triton appears to be connected with an improvement of endogenous synthesis, since an increased incorporation of labelled acetate in cholesterol has been obtained[9].

We used male albino rats of mean weight of 250 g; cholesterol was determined according to Grigaut[10], serum lipids with the micromethod of Swahn[11], and lipoproteins pattern with paper electrophoresis according the classical method modifies as elsewhere reported[12].

The results are summarized in the following 2 Tables.

We want to point out that diphenylilethylacetate not only has fmarked anti-hypercholesteremic and anti-hyperlipemic activity, but is also able to modify intensively the lipoproteic pattern. In fact, while treatment

[1] B. B. Migikowsky and D. D. Greenberg, Biochim. biophys. Acta *13*, 135 (1954). – M. D. Siperstein *et al.*, Science *113*, 747 (1951).

[2] R. R. Guehering *et al.*, J. biol. Chem. *197*, 485 (1952). – L. Swell *et al.*, J. Nutr. *57*, 121 (1955).

[3] J. Cottet *et al.*, Presse méd. *62*, 939 (1954); Thérapie *9*, 621 (1954).

[4] R. Kaplan and F. Lipmann, J. biol. Chem. *174*, 37 (1948). – D. Steinberg and D. S. Fredrickson proved very recently that phenylethylacetic acid can inhibit cholesterol synthesis *in vitro* from acetate, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *90*, 232 (1955).

[5] S. Garattini, C. Morpurgo, and N. Passerini, G. ital. Chemioter. *2*, 60 (1955); Boll. Soc. ital. Biol. sper. *31*, 1653 (1956).

[6] S. Garattini *et al.*, Arch. Int. Pharm. (1956) (in press).

[7] Synthetized by G. Cavallini and E. Massarani of Maggioni Lbs. of Milan, Farmaco (1956) (in press).

[8] M. Friedman and S. O. Byers, J. exper. Med. *97*, 117 (1953). – Triton W. R. 1339: a polymer of *p*-isooctylpolyoxyethylenphenol, of Rohm & Haas Co., Philadelphia.

[9] J. D. Frantz and B. T. Hinkelman, J. exper. Med. *101*, 225 (1953).

[10] A. Grigaut, C. r. Soc. biol. *68*, 791 (1910).

[11] B. Swahn, Scand. J. clin. Lab. Invest. *5* (1953), suppl. 9.

[12] S. Garattini and B. Murelli, G. Biochim. *5*, 98 (1956).

with Triton clearly displaces the β/α-ratio towards the high molecular weight lipoproteins (those same lipoproteins which increase in human and experimental atherosclerosis, diphenylilethylacetic acid makes the lipoproteic pattern return to normal, inhibiting the formation of β-lipoproteins.

Number of rats	Treatment: Triton mg/kg intravenous	Diphenylilethylacetate* mg/kg intraperitoneal**	Serum cholesterol mg/100 ml (and standard deviation)
50	–	–	77 ± 3·70
50	200	–	269 ± 8·54
15	200	100	152 ± 16·53

* Triton and Sodium diphenylilethylacetate were given at the same time to animals fasted for 12 h. The animals were killed 18 h after administering Triton.

** It has been demonstrated in other experiments that diphenylilethylacetic acid can inhibit the effects of Triton also when given *per os* (250 mg/kg). Diphenylilethylacetic acid does not cause variations of normal cholesteremia when used in the doses reported by us.

Number of rats	Triton mg/kg	Treatment: Diphenylilethylacetate mg/kg intraperitoneal *	Serum total lipids mg/100 ml	Lipoproteins**			
				α	β	X	β/α
30	–	–	200 ± 15·93	34·8	48·4	14·8	1·3
15	200	–	1008 ± 56·24	11·52	71·7	16·2	6·2
10	200	100	481 ± 49·37	23·15	53·8	22·6	2·2

* We demonstrated in other experiments that diphenylilethylacetic acid can inhibit the effects of Triton also when given *per os* (250 mg/kg).

** In the present elaboration of data, lipoproteins have been divided on the grounds of their localization on the protein electrophoretic pattern.

Diphenylilethylacetic acid, which is very well tolerated by man in doses of 300 mg daily, has been used recently also in clinical trials and gave good results in cases of hypercholesteremia[13].

S. Garattini, C. Morpurgo, and N. Passerini

Institute of Pharmacology, University of Milan, Italy, April 20, 1956.

Résumé

On prouve que l'acide diphénylilléthylacétique, qui exerce un effet d'inhibition sur l'activité acétylante du coenzyme A, peut aussi causer une diminution de l'hypercholestérolémie et de l'hyperlipémie provoquées par une administration de Triton.

[13] G. Annoni, Farmaco *11*, 244 (1956).

Isolation of a Cytochrome of the Antimycin A Sensitive Pathway for DPNH Oxidation

A cytochrome has been isolated from pig, guinea pig or rat liver, having the following absorption peaks: 404 and 500 mμ in oxidized state and 428 and 556 mμ in reduced state.

This cytochrome was prepared from liver using essentially the method of Edelhoch *et al.*[1] for DPNH-cytochrome c reductase. With rat and guinea pig liver the cytochrome is not extracted by 10% ethanol at 40° C, but can be obtained by a subsequent extraction with *M*/20 orthophosphate buffer pH 7·4. With pig liver this cytochrome is obtained in the ethanol extract, together with DPNH-cytochrome c reductase, but can be separated from it by ammonium sulfate fractionation.

This cytochrome is reduced by hydrosulfite, and leucomethylene blue, but not by reduced glutathione or ascorbic acid. It is not reduced by DPNH-cytochrome c reductase, unless Slater[2] factor is present.

To obtain the Slater factor, rat liver homogenate is taken to pH 5·4, and the precipitate extracted with a digitonin solution. Reduction of the present cytochrome by DPNH-cytochrome c reductase is a specific test for this factor, the reaction being inhibited by antimycin A. In this reaction Slater factor can be replaced by methylene blue, which is reduced by the reductase and reoxidized by the present cytochrome, but not inhibited by antimycin A.

It is remarkable that DPNH-cytochrome c reductase is able to reduce cytochrome c directly, but the present cytochrome, which has a lower redox potential, only through Slater factor.

0·01 *M* orthophosphate inhibits the reduction of cytochrome c, by reductase, probably by combining with its iron[3], and inhibits also the reduction of the present cytochrome. Removal of the bound iron of the reductase by dialysis against 8-hydroxyquinoline transforms this enzyme to a diaphorase, which reduces the new cytochrome even in the presence of orthophosphate.

Although the present cytochrome has a different absorption spectrum from the other cytochromes recently described[4], it may turn out to be identical with one of them.

The present cytochrome transports electrons from leucomethylene blue to hydroxylamine. This fact has been erroneously interpreted[5], as hydroxylamine inhibiting the reduction of methylene blue by reductase. This "inhibition" required a factor which had been called hydroxylamine inhibition factor. The factor is now identified with the present cytochrome, which reoxidizes the methylene blue, reduced by the reductase. It was shown[6] that this cytochrome is necessary for the oxydative phosphorylation coupled to DPNH oxidation by cytochrome c, in a soluble system.

I. Raw

Departamento de Química Fisiológica, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Brasil, April 17, 1956.

[1] H. Edelhoch, O. Hayaishi, and L. J. Teply, J. biol. Chem. *197*, 97 (1952).

[2] E. C. Slater, Biochem. J. *46*, 499 (1950).

[3] H. R. Mahler and D. G. Elowe, J. biol. Chem. *210*, 165 (1954).

[4] D. Keilin and E. F. Hartree, Nature *176*, 200 (1955). – R. Kunn, Proc. Soc. exper. Biol. Med. *77*, 441 (1955). – C. Wildmer, H. W. Clark, H. A. Neufeld, and E. J. Stotz, J. biol. Chem. *210*, 861 (1954). – R. W. Eastabrook, Fed. Proc. *14*, 45 (1955).

[5] I. Raw, Science *118*, 159 (1953).

[6] I. Raw, J. Amer. chem. Soc. *77*, 503 (1955).

Zusammenfassung

Ein neues Cytochrom ist aus Schweineleber isoliert worden. Es wird durch DPNH-Cytochrom-c-Reduktase reduziert. Antimycin A hemmt diese Reaktion, die nur in Gegenwart des Slater-Faktors abläuft.

Es ist wahrscheinlich, dass dieses Cytochrom in die Elektronentransportreihe, und zwar zwischen Reduktase und Cytochrom c, eingeschaltet ist.

Effects of Ultraviolet Light on some of the Electrical Characteristics of Action Potentials of Single Unmyelinated Nerve Fibers of the Crab *Carcinus*[1]

As a corollary to photochemical work done in this laboratory with single myelinated nerve fibers[2], a number of experiments have been carried out to test the effects of monochromatic ultraviolet irradiation on resting single unmyelinated fibers from the walking leg of the crab, *Carcinus maenas*.

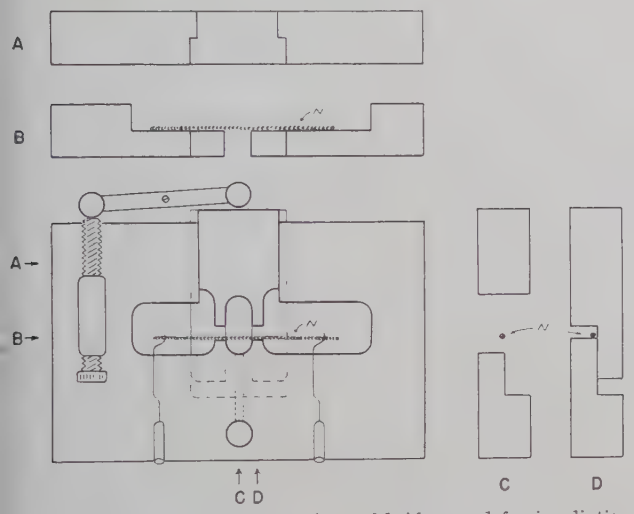


Fig. 1.—Top view and cross-sections of bridge used for irradiation of single crab neurons. Further description in text.

The nerve was obtained by the "pullout" technique of Furusawa[3], and a single large fiber (20–30 μ in diameter) was isolated, the dissection being carried out in artificial sea water[4]. After isolation, the nerve was mounted on the bridge diagrammed in Figure 1. This apparatus consisted basically of three pieces of perspex, one a large block, not shown in the Figure, which served as a base for the bridge and which held a quartz window directly under the region of the nerve to be irradiated. The upper part of this bridge, shown in the drawing, was screwed onto the base. It was so constructed that the fiber (*N*) lay across three wells containing sea water. The ends of the fiber were clamped to the floors of their respective wells by stainless steel electrodes. The center well was connected by a tunnel to a fourth well, in which was immersed a Ag–AgCl electrode in sea water agar. The channel in which the nerve lay could be altered in width by a screw-and-lever mechanism which allowed fine movement of a separate, close-fitting, perspex block from which the walls of one side of the channel had been machined. With the nerve in position, the width of these channels could be brought to within a few microns of the diameter of the fiber, providing a high electrical resistance between the three wells without mechanical damage to the fiber itself. It will be seen from cross sections *B* and *C* that the space under the nerve in the center well was open, that is, filled only with sea water. The floor of this space was formed by the quartz window in the base block, through which the entire length of the fiber in the center well (0·6 mm across) could be irradiated from underneath.

The circuit for stimulating and recording is that shown in Figure 2. A Grass stimulator provided monophasic square wave impulses of 0·5 ms duration at a frequency of 10/s. The intensity of the shock could be read, in relative values, from a graduated potentiometer. For protection of the nerve, a resistance of 470 kΩ and capacity of 0·01 μf were placed in series across the stimulating electrodes. Another capacity and resistance, 200 kΩ and 100 pf, (RC = 20 μs) could be switched into the recording circuit for obtaining "differentiated action potentials" on the oscillograph. Variables measured during any given experiment were threshold, height of the spike, and, from the "differentiated action potential", the rate of rise of the spike.

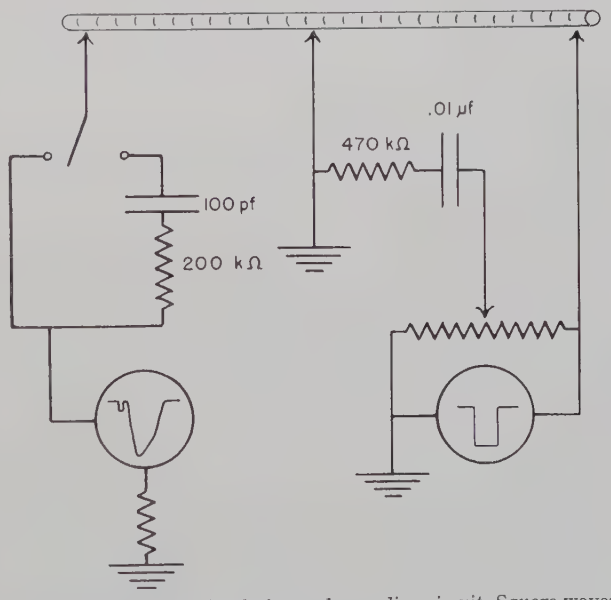


Fig. 2.—Diagram of stimulating and recording circuit. Square waves from Grass stimulator (right); recordings over de Gruyter pre-amplifier and Dumont double-beam cathode ray oscillograph (left).

Radiation of $\lambda = 265$ mμ was obtained by double monochromation of radiation from a Philips high pressure mercury arc. The monochromator used has been

[1] This work was carried out during the tenure of a Postdoctoral fellowship from the United States Public Health Service.

[2] M. Hutton-Rudolph, Helv. physiol. Acta *1*, C15 (1943); Dissertation, Bern 1944. – J. Booth, A. v. Muralt, and R. Stämpfli, Helv. physiol. Acta *8*, 110 (1950). – A. v. Muralt and R. Stämpfli, Helv. physiol. Acta *11*, 182 (1953). – H.-C. Lüttgau, Helv. physiol. Acta *12*, C56 (1954); Pflügers Arch. ges. Physiol. *262*, 244 (1956).

[3] K. Furusawa, J. Physiol. *67*, 325 (1929).

[4] Based on an analysis of North Sea water, with the following ionic molarities (m*M*/*L*): Na^+ – 477·4; K^+ – 9·0; Mg^{++} – 55·0; Ca^{++} – 8·1; Cl^- – 552·2; $SO_4^=$ – 28·0; NO_3^- – 1·2; HCO_3^- – 2·6; $HPO_4^=$ – 0·3. Total ionic molarity – 1·1338.

described by v. Muralt and Stämpfli[5], and the technique for focussing the beam on the desired region of the nerve by Hoppe and v. Muralt[6].

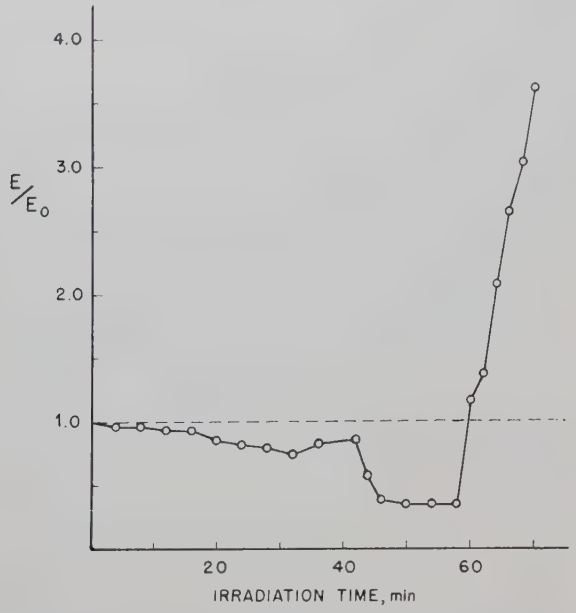


Fig. 3.—Changes in threshold of single crab neuron with irradiation. Nerve presumably stimulated in unirradiated zone.

After the nerve was mounted on the bridge in position to be irradiated, the variables to be measured were checked at intervals for 20–30 min to ensure that the fiber was in good condition, and then the irradiation was started and allowed to continue to the end of the experiment. The nerve was stimulated only for brief periods every 2 min when the readings were taken.

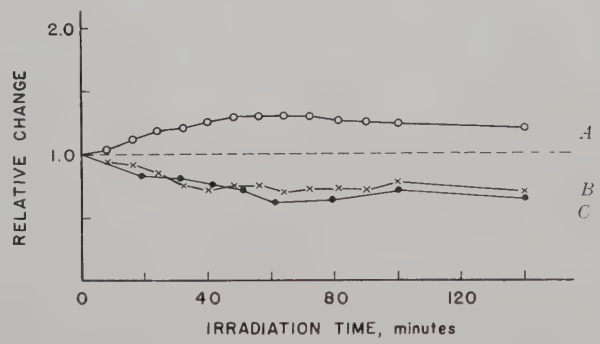


Fig. 4.—Changes in (*A*) threshold, (*B*) spike height, (*C*) rate-of-rise of action potential of single crab neuron with irradiation. Nerve presumably stimulated in irradiated zone.

Two types of results were encountered, one when using the bridge as described and the other after a slight modification of the technique. In the one case, illustrated in Figure 3, the threshold decreased slightly, then decreased markedly during a period of "over-excitability", and finally rose sharply until the fiber became inexitable. This type of curve is very similar to that found both by Hutton-Rudolph and Booth *et al.*[2] when irradiating the internode of a myelinated fiber. Since the current density of the stimulus shock is greatest where the fiber enters the channel between wells, it is possible that in this type of experiment the fiber is not being stimulated in the irradiated region at all, but inside the channel where it is shielded by the perspex floor. The decrease in threshold can be ascribed to a partial depolarization due to injury potentials from the irradiated region. When the injury potentials become of sufficient magnitude, the resting potential is eventually reduced to the point where the fiber becomes inexitable. In these final stages the threshold rises steeply.

The second type of result encountered is shown in Figure 4. In these experiments, the walls of the channels were coated with a fairly thick insulating layer of vaseline, so the fiber would be stimulated in an irradiated region in the open center well rather than in the channels. That this vaseline coat effectively raised the resistance in the channels is evidenced by the fact that the output of the stimulator required to reach threshold was reduced by a factor of 20 from the preceding experiment. Here we see that, with the onset of irradiation, the threshold rises while the height and rate-of-rise of the action potential decreases all 3 parameters leveling off at new values and remaining fairly constant for several hours. It is probable in this case that the irradiated side of the fiber has been inactivated, while the unirradiated side has remained relatively intact, the results of the damage only partially affecting the electrical characteristics as measured. Unilateral damage of this type is not surprising in view of the fact that, at $\lambda = 265$ mμ, the extinction of this type of fiber is about 3[7]. In other words, the intensity at the surface away from the source is only $^1/_{10}$ of 1% of that impinging on the exposed surface. The possibility that the unexposed surface remains excitable would further suggest that, in the first type of result, the final steep rise in threshold was due to causes other than the irradiation.

It will be noted that these experiments ran for times of 1–3 h, whereas the work on myelinated fibers at this wavelength involves radiation times of the order of 10 min. Further experiments with unmyelinated fibers should include (1) an arrangement for exposing the surface to irradiation from all sides and (2) assurance that the stimulus is applied and the readings are made in the irradiated zone of the fiber.

John S. Cook[8]

Physiologisches Institut, "Hallerianum", Bern, June 15, 1956.

Zusammenfassung

Die marklosen Nerven-Einzelfasern von *Carcinus maenas* wurden mit monochromatischem Ultraviolett bestrahlt. Zuerst tritt bei Bestrahlung ein langsamer Abfall der Reizschwelle, dann ein rascher Abfall, gefolgt von einem steilen Anstieg auf. Der Abfall rührt von einer Depolarisation her, deren Zunahme dann zu Unerregbarkeit führt. Durch Verbesserung der Ableitungstechnik konnten die elektrischen Veränderungen lokalisiert an der bestrahlten Stelle gemessen werden. Anstieg der Reizschwelle, Abfall der Steilheit und Abfall der Höhe des Spitzenpotentials wurden auch bei diesen marklosen Fasern beobachtet, aber nicht so ausgeprägt wie bei der Bestrahlung markhaltiger Fasern.

[5] A. v. Muralt and R. Stämpfli, Helv. physiol. Acta *11*, 182 (1953).

[6] W. Hoppe and A. v. Muralt, Helv. physiol. Acta *12*, C54 (1954).

[7] H. Bammer (personal communication).

[8] Present Address: Department of Physiology, New York University, Medical College, New York.

Prolongation of Hypnosis by 5-Hydroxytryptamine (Serotonin)

Shore, Silver and Brodie[1], in a recent note in this Journal, have described experiments in which the sleeping times of mice pretreated with 5-hydroxytryptamine (5-HT) were compared with those given hexobarbitone alone. The mean sleeping time for the mice given 5-HT before the hexobarbitone was found to be some 300% longer than that of the controls. Moreover, the hypnosis-prolonging effect of 5-HT was substantially diminished when mice were given prior to 5-HT the compound, lysergic acid diethylamide, which is known to antagonize several actions of 5-HT and which has also the interesting property of producing in man mental disturbances resembling schizophrenia. These observations were held to support the concept advanced by Woolley and Shaw[2] "that serotonin has an important role to play in mental processes and that the suppression of its action results in a mental disorder".

Now when they put forward this idea, Woolley and Shaw added: "Of course, this may be the wrong inference from the pharmacological findings... The mental disturbances may be no more than the reflection of diminished blood flow which they (certain chemical analogues of 5-HT) may cause in the brain. To this objection there is as yet no adequate answer, and it may be the true explanation." The possibility that the hypnosis-prolonging action of 5-HT is secondary to an action on blood vessels must, I believe, still be considered in view of some of the following observations.

Like Shore, Silver, and Brodie, I have found that 5-HT can potentiate considerably the hypnotic effect of a barbiturate. I would agree with them that this effect is unlikely to be due to a specific interference with the detoxication of barbiturates, for I have found that the hypnotic effect of chloral hydrate is similarly increased in duration by 5-HT (Table). This property of 5-HT does not appear to be highly specific, however. I have noted it, not only with bufotenine and tryptamine itself, but also with several other compounds which do not resemble 5-HT nearly so closely, e.g. adrenaline and histamine (Table).

Effect of various compounds on the duration of the sleep produced in mice by the intraperitoneal injection of either cyclobarbitone (100 mg/kg) or chloral hydrate (250 mg/kg).
Each compound was injected either intraperitoneally (i.p.) or subcutaneously (s.c.) 10 min before the hypnotic. The sleeping times given are the means for groups of 10 mice – in each experiment the hypnotic was given to 20 mice, 10 of which had already received the compound under investigation. The figure in brackets after each mean sleeping time is the standard error for the 10 observations. The 't' test shows most of the differences to be significant at the P = 0·01 level and almost all at the P = 0·1 level.

(1) Experiments with cyclobarbitone

Pre-treatment			Sleeping time: Treated group	Sleeping time: Control group
			min	min
5-HT	20 mg/kg	i.p.	80 (7·8)	33 (2·2)
5-HT	20 mg/kg	s.c.	88 (8·8)	47 (7·3)
5-HT	20 mg/kg	s.c.	67 (19·8)	25 (4·4)
5-HT	20 mg/kg	s.c.	61 (10·1)	36 (3·7)
Histamine	20 mg/kg	i.p.	68 (6·7)	42 (5·0)
Histamine	20 mg/kg	i.p.	73 (3·9)	44 (4·9)

(2) Experiments with chloral hydrate

Pre-treatment			Sleeping time: Treated group	Sleeping time: Control group
			min	min
5-HT	20 mg/kg	i.p.	86 (12·1)	20 (2·3)
Bufotenine	20 mg/kg	i.p.	81 (10·4)	22 (2·8)
Tryptamine	20 mg/kg	i.p.	37 (3·1)	22 (2·4)
Histamine	10 mg/kg	i.p	38 (3·1)	26 (3·1)
Histamine	10 mg/kg	i.p.	51 (3·9)	26 (4·2)
Histamine	10 mg/kg	s.c.	54 (5·1)	32 (3·7)
Adrenaline	5 mg/kg	i.p.	98 (13·0)	35 (5·6)
Adrenaline	5 mg/kg	s.c.	70 (19·2)	20 (3·3)
Adrenaline	3 mg/kg	i.p.	65 (9·6)	24 (2·3)
Adrenaline	3 mg/kg	s.c.	39 (4·1)	31 (4·9)

Other workers have published similar findings. For example, Werle and Lentzen[3] showed that various vasoactive drugs (histamine, vasopressin, adrenaline and sympatol, but not acetylcholine or adenylic acid) could deepen and prolong the sleep produced in the rabbit by evipan and other, unrelated hypnotics. Certain carbohydrate metabolites[4], colchicine[5], and even some purely inorganic agents[6] – notably potassium salts[7] – have been found capable of prolonging the hypnotic effect of barbiturates.

If, as seems likely[4], the prolongation of barbiturate anaesthesia by such agents as lactate and glutamate is brought about through the mediation of adrenaline, it follows that almost all of the known hypnosis-prolonging agents are drugs which exert, directly or indirectly, powerful effects on the circulatory system. It therefore seems possible that the ability of 5-HT to prolong hypnosis may be due to a relatively unspecific, vascular effect.

F. N. Fastier

Department of Medicine, Otago University Medical School, Dunedin, New Zealand, May 13, 1956.

Zusammenfassung

Die Angabe, dass 5-Oxytryptamin (Serotonin) die Chloralhydrat- oder Barbitursäure-Hypnose bei Mäusen verlängern kann, wurde bestätigt. Da aber Stoffe wie Adrenalin und Histamin den gleichen Effekt zeigten, erscheint es möglich, dass die hypnoseverlängernde Eigenschaft des 5-Oxytryptamin auf einen relativ unspezifischen, vaskulären Effekt zurückzuführen ist.

[1] P. A. Shore, S. L. Silver, and B. B. Brodie, Exper. *11*, 272 (1955).

[2] D. W. Woolley and E. Shaw, Proc. nat. Acad. Sci. *40*, 228 (1954).

[3] E. Werle and J. Lentzen, Arch. exper. Path. Pharmakol. *190*, 328 (1938).

[4] P. D. Lamson, M. E. Greig, and L. Williams, J. Pharmacol. exper. Therap. *106*, 219 (1952).

[5] R. W. Balek, J. J. Kocsis, and E. M. K. Geiling, J. Pharmacol. exper. Therap. *116*, 5 (1956).

[6] R. K. Richards, E. L. Bertcher, and J. D. Taylor, Arch. int. Pharmacodyn. *89*, 463 (1952).

[7] L. Lasagna, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *80*, 568 (1952).

Selektive insektizide Wirkung des Butazolidins

Ein Laborant, der seit mehr als 10 Jahren einen Laboratoriumsstamm von *Pediculus humanus v. corporis* unterhält, stellte eines Tages fest, dass sämtliche Läuse (etwa 600) aller Stadien, die er sich vormittags zum Füttern angesetzt hatte, abends tot waren. Dieses Phänomen wiederholte sich am nächsten Tag mit 50 frischen Läusen, die er sich ansetzte. Es ergab sich, dass diese Person in ärztlicher Behandlung stand. Sie hatte an diesen zwei Tagen sowie an den zwei denselben unmittelbar vorangegangenen Tagen je eine intramuskuläre Einspritzung von 600 mg Butazolidin (B.) erhalten.

Das folgende Experiment mit reinem B. ergab, dass die insektizide Wirkung nicht auf dem Lokalanästhetikum beruhte, welches das zu therapeutischen Zwecken benützte Präparat enthält.

Ein Kaninchen von 3 kg Gewicht erhielt intravenös 2 cm^3 einer 1prozentigen Lösung des Natriumsalzes des B.[1] sowie 0,2 cm^3 Liquemin (Hoffmann-La Roche). 5 min später wurde dem Tier Blut entnommen und damit 50 Läusen mit einer Mikropipette ein Klystier verabreicht. Die durchschnittliche Menge Blut, die je Laus verabreicht wurde, betrug 1,32 mg. Nach 3 h waren 49 der 50 Läuse tot. Blut, das diesem Kaninchen 24 h später entnommen wurde, hatte keinen Einfluss auf die 50 Läuse, welche damit rektal inokuliert wurden. Zur Verhinderung der Gerinnung des Blutes waren wieder 0,2 cm^3 Liquemin verabreicht worden.

Beobachtungen an grösseren Serien von Läusen, die rektal mit steigenden Verdünnungen von B. in menschlichem Zitratblut inokuliert wurden, ergab, dass die DL_{50} zwischen 0,02 und 0,04 γ je Laus lag.

Überraschender als die Toxizität des B. für *Pediculus* war die Beobachtung seiner selektiven Wirkung. Auf einem Kaninchen, das unmittelbar vorher intravenös 70 mg B./kg erhalten hatte, wurden Imagines und Nymphen des ersten und zweiten Stadiums von *Ornithodorus moubata* gefüttert. Die Imagines von *O. moubata* waren nach 3 Wochen noch munter, einige Weibchen legten Eier. Hingegen fiel auf, dass die Nymphen, welche sich während der ersten Tage nach der Blutmahlzeit normal verhielten, sich in der Folge nicht häuteten und innerhalb von drei Wochen eingingen. Bei einigen Exemplaren war es zwar zur Bildung einer Exuvie gekommen, doch starben auch diese Exemplare, ohne die Exuvie abgeworfen zu haben.

H. Mooser

Hygiene-Institut der Universität Zürich, den 28. Juni 1956.

Summary

Butazolidin proved to be insecticidal by ingestion for *Pediculus humanus* and for the first and second instars of *Ornithodorus moubata*. Adult specimens of *O. moubata* were not affected.

[1] Wir verdanken diese Lösung dem Entgegenkommen der Firma J. R. Geigy AG., Basel.

Multiple Hemoglobins in Birds[1]

Multiple hemoglobins have been demonstrated in certain cattle[2], in man under normal[3] and pathological conditions[4], and in the domestic fowl[5]. Subsequent to the initiation of our investigation Rodnan and Ebaugh[6] have reported the occurrence of multiple hemoglobins in a variety of vertebrate species. Most of the mammals studied had only a single hemoglobin component, although the horse was an exception. Among the birds studied, it was reported that chicken, duck, and robin had multiple components as contrasted to the single-component hemoglobin of the pigeon and penguin (species not given). The results of this investigation, together with those reported herein, indicate that the occurrence of more than one hemoglobin component is a common, although not general, phenomenon among adult birds.

In the course of our investigations, analyses were made of the blood of 21 species of birds. The wild birds were collected in Whitman County, Washington, during the period April 1955 to April 1956. Samples of blood were drawn directly from the heart into a syringe wetted with a 1:10 000 solution of heparin. Cells were separated from the plasma by centrifugation at 3000 rpm for 15 min and then washed thrice with 0·85% NaCl solution. The hemoglobin was released by the addition of an equal volume of distilled water to the packed cells. Cellular debris was then removed by centrifugation at 15 000 rpm for 30 min. The hemoglobin solutions were frozen and stored at $-10°$ C until analyzed.

Electrophoretic patterns were obtained by applying 10 microliters of the hemoglobin solution to filter paper strips (Whatman 3 MM). The strips were moistened with veronal buffer (pH 8·7, ionic strength 0·075). A constant current of 0·092 mA/mm width was applied for 6 h. After drying, and without staining, the strips were scanned and integrated using a Spinco Analytrol. Percentages of the hemoglobin components were estimated by planimetry. In accordance with the terminology of Johnson and Dunlap[5] the anionic migrant is designated as α and the cationic migrant as β.

Among those species examined, all except the domestic pigeon were found to have 2 hemoglobin components. Although the pigeon pattern was skewed there was no definite separation. This conforms with the analysis of Rodnan and Ebaugh[6]. There were rather marked differences in the distinctness of separation among the hemoglobins of the various species (see Figure and Table). In the galliform birds and ducks the separation was relatively slight (+), whereas the two woodpeckers exhibited fair to good separation (++ to +++). Among the passeriform birds the separation was good to excellent (+++ to ++++), with the exception of the American Magpie (*Pica pica americana*) in which the separation was only fair (++). The relative percentages of α- and β-hemoglobin in the species studied are presented in the Table. The relative percentages of the two

[1] Approved by the Washington Agricultural Experiment Stations for publication. The investigation reported herein was supported, in part, from funds provided for biological and medical research by the State of Washington Initiative Measure No. 171.

[2] R. Cabannes *et al.*, C. r. Soc. Biol. *149*, 7 (1955).

[3] H. G. Kunkel and G. Wallenius, Science *122*, 288 (1955).

[4] A. I. Chernoff *et al.*, Science *120*, 605 (1954).– T. H. J. Huisman *et al.*, Nature *175*, 902 (1955).– H. A. Itano, Science *117*, 89 (1953); Arch. int. Med. *96*, 287 (1955).

[5] V. L. Johnson and J. S. Dunlap, Science *122*, 1186 (1955).

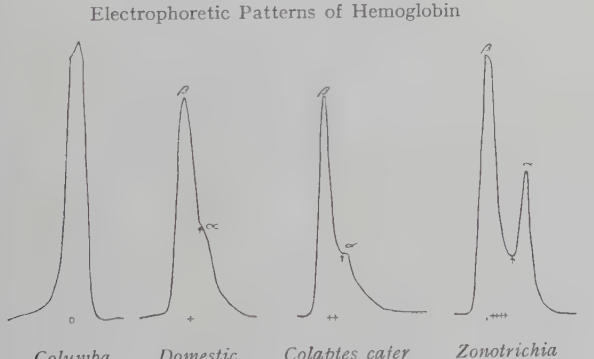
[6] G. P. Rodnan and F. G. Ebaugh, Fed. Proc. *15*, 155 (1956).

The relative distributions of α-hemoglobin and β-hemoglobin in 21 species of birds, Expressed as percentage of total hemoglobin

	Number of Specimens	α-hemoglobin			β-hemoglobin			Degree of Separation*
		maximum	minimum	mean	maximum	minimum	mean	
Passeriformes								
Zonotrichia leucophrys gambelii	26	39·9	23·5	30·4	76·5	60·2	69·6	+ + + +
Melospiza lincolnii	6	33·7	17·8	26·5	82·2	66·3	73·5	+ + + +
Melospiza melodia	17	41·5	25·0	32·1	75·0	58·5	67·9	+ + + +
Spizella passerina arizonae	3	32·5	26·9	28·8	73·1	67·5	71·2	+ + +
Spizella arboracea ochracea	1	–	–	26·3	–	–	73·7	+ + + +
Spinus tristis	3	35·8	26·6	31·0	73·4	64·2	69·0	+ + + +
Junco oreganus	14	37·3	24·9	31·1	75·1	62·7	68·9	+ + + +
Hesperiphona vespertina	1	–	–	23·0	–	–	67·0	+ + + +
Sternus neglectus	1	–	–	27·2	–	–	72·8	+ + +
Passer domesticus	3	25·6	17·8	22·5	82·3	74·4	77·5	+ + + +
Parus gambeli	3	33·2	27·6	30·3	72·4	66·8	69·7	+ + + +
Pica pica hudsonia	2	35·4	27·2	31·3	72·8	64·6	68·7	+ +
Turdus migratorius	1	–	–	25·4	–	–	74·6	+ + + +
Empidonax hammondii	1	–	–	29·2	–	–	70·8	+ + + +
Piciformes								
Colaptes auratus borealis	1	–	–	29·1	–	–	70·9	+ + +
Colaptes cafer collaris	1	–	–	20·8	–	–	79·2	+ +
Anseriformes								
*Anas platyrhynchos***	2	28·0	23·8	25·9	76·2	72·0	74·1	+
Galliformes								
Domestic Fowl (White Olympian–New Hampshire hybrid)	5	34·7	19·6	25·8	80·4	65·3	74·2	+
*Meleagris gallopavo****	4	52·2	44·8	49·3	55·3	47·8	50·7	+
Phasianus colchicus	1	–	–	19·6	–	–	80·4	+
Columbiformes								
Columba livia	5	?	?	?	?	?	?	0

* See the Figure. ** One domestic and one wild. *** Domestic.

components in the White-crowned Sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*) were analyzed statistically with respect to differences between the sexes; no sex differences were demonstrable. Similarly no differences could be demonstrated between first-year (4–8 months



old) and adult (more than 1 year old) birds. It should be noted that Rodnan and Ebaugh[6] found 3 components in the hemoglobin of the domestic fowl. It is possible that this separation, in contrast to the 2 components found in our analyses, may be explained by the lower hydrogen-ion concentration (pH 9·2) used in their investigations. However, the two investigations apparently produced similar results for the American Robin (*Turdus migratorius*).

From a systematic aspect, it is of interest to note that marked differences exist among the orders examined and that the differences among families within an order, and genera within a family, are successively less striking. It is of interest also to note the single-component hemoglobin of the pigeon, a member of the Columbifomes, an order of several anatomic and physiologic peculiarities. These observations, together with the report of a single hemoglobin in a penguin species[6], indicate that an extensive study of the hemoglobin components among the orders of birds might produce information of considerable usefulness in understanding systematic relationships among the orders of birds.

Jack S. Dunlap, Verner L. Johnson, and Donald S. Farner

Department of Veterinary Pathology, Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, Laboratories of Zoophysiology, State College of Washington, Pullman, Washington, June 4, 1956.

Zusammenfassung

Papierelektrophorese des Hämoglobins von zwanzig Vogelarten aus vier verschiedenen Ordnungen ergab zweiteilige Diagramme. Nur bei der Taube ist das Hämoglobin einheitlich, während sonst ziemlich allgemein in der Klasse der Aves zwei Komponenten nachweisbar sind.

DISPUTANDA

Le développement des ovaires des ouvrières des abeilles et l'ectohormone des reines

Dans une note récemment publiée, Voogd[1] critique les travaux de Pain. Il serait souhaitable toutefois que Voogd ait pris la peine de les comprendre d'une manière plus exacte; tout d'abord la variabilité des ovaires des abeilles nous est connue depuis les travaux de Hess[2]. Les précautions que préconise Voogd pour réduire cette variabilité nous sont familières et sont couramment pratiquées dans tous les laboratoires d'Apiculture. Quant au fait que chaque expérience doit être répétée plusieurs fois, il fait partie de l'A.B.C. de l'expérimentateur. Nous voulons espérer que Voogd n'a pas voulu insinuer qu'un de ses collègues ne prend pas ces précautions aussi bien qu'elle.

Fig. 1. 2 jeunes abeilles sont attirées par une goutte d'extrait acétonique de reines, déposée à l'extrémité d'une pipette Pasteur (vue prise par en-dessous, les abeilles se trouvaient sur un bloc transparent de plexiglass).

Plus graves seront nos critiques concernant la note de Voogd qui semble croire comme Butler[3] que l'hypothèse d'une substance de fertilité (et non pas d'une *hormone*, terme que Mlle Pain a employé pour la substance de fertilité mais qui nous semble maintenant impropre) est contradictoire avec l'hypothèse de l'ectohormone inhibitrice. Il n'en est rien et dans notre esprit, *les deux facteurs accélérateur et inhibiteur peuvent très bien opposer leurs effets.* Rappelerons-nous qu'il en est ainsi dans une foule de processus physiologiques ? L'existence d'une substance de fécondité, d'un facteur trophique, nous paraît impliquée très clairement dans les expériences de Mlle Pain et dans celles de Müssbichler[4] telles que les interprète Mlle Pain[5]. Cette hypothèse est seule capable, à notre idée, d'expliquer le peu de développement ovarien pendant un élevage royal et la reprise de ce développement après l'operculation de la cellule royale (Müssbichler). Quant au rôle de l'ectohormone inhibitrice, il nous semble (si nous interprétons justement les résultats de Voogd) que cet auteur suppose que la substance devrait être déposée sur le corps d'une abeille pour être efficace et pour évoquer l'attitude typique des abeilles vis-à-vis de cette substance; son principal argument résulte de l'inefficacité de l'ectohormone mélangée au liquide nutritif. Or, dans un travail précédent Voogd[6] indique pourtant que le comportement caractéristique a été évoqué à l'aide d'extraits de reines imprégnant des *morceaux de bois.* Par conséquent, une stimulation annexe produite par le corps même de l'abeille ne paraît pas nécessaire d'après Voogd elle-même. En tout cas, nous nions formellement cette nécessité, étant donné que Mlle Pain a obtenu un comportement caractéristique avec une reine réduite en poudre et aussi, un très grand nombre de fois, avec une parfaite netteté, avec quelques gouttes d'extrait de reines déposées sur un morceau de papier-filtre. La non-efficacité de la substance mélangée à la nourriture dans les expériences de Voogd nous paraît pouvoir s'expliquer assez simplement. Voogd a remarqué comme nous que les abeilles auxquelles on présente l'ectohormone cherchent à entrer avec elle en contact antennaire ainsi que le montre la Figure 2 ci-jointe. Il est probable que la stimulation antennaire n'est pas la même lorsque les abeilles boivent simplement un liquide; *la stimulation antennaire se joignant à l'ingestion d'ectohormone serait indispensable à l'obtention du phénomène.* Ces actions complexes à point de départ sensoriel sont connues dans le monde des insectes et l'un de nous les a mises, il y a longtemps, en évidence sur le «Criquet pelerin» (Chauvin[7]). Ajoutons d'ailleurs que Stumper[8] vient d'extraire des reines des fourmis, une substance qui, déposée sur un support inerte et amorphe évoque précisément de la part des fourmis les mêmes réactions que vis-à-vis d'une reine.

Fig. 2. Abeille attirée par un morceau de sureau légèrement imbibé d'extrait de reines.

Enfin l'efficacité de l'ingestion de l'ectohormone a été éprouvée par Butler[9] qui a obtenu l'inhibition ovarienne des ouvrières en mélangeant seulement à leur nourriture le contenu du tube digestif de plusieurs de leurs congénères, qui, elles, avaient léché la reine.

R. Chauvin et Janine Pain

Station de Recherches Apicoles de Bures-sur-Yvette, France, le 9 juin 1956.

[1] S. Voogd, Exper. *12*, 199 (1956).
[2] G. Hess, Beih. schweiz. Bienenztg. *1*, 33 (1942).
[3] C. Butler, Ann. Rev. Entom. *1*, 281 (1956).
[4] A. Müssbichler, Z. vgl. Physiol. *34*, 207 (1952).
[5] J. Pain, Insectes sociaux *1*, 59 (1954).
[6] S. Voogd, Exper. *11*, 181 (1955).
[7] R. Chauvin, Annales Soc. entom. France *110*, 133 (1941).
[8] R. Stumper, C. r. Acad. Sci. *242*, 2487 (1956).
[9] C. Butler, Rep. Rothamst. exp. Sta. 133 (1954).

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll die Begriffe der «Fruchtbarkeitssubstanz» und des «hemmenden Ektohormons» näher bestimmen. Nach unserer Ansicht können aktivierende und hemmende Faktoren einander entgegengesetzte Wirkungen haben. Das Vorhandensein einer Fruchtbarkeitssubstanz bzw. eines trophischen Faktors geht aus unseren Versuchen ebenso wie aus denjenigen Müssbichlers hervor; dies steht aber nicht im Gegensatz zur Wirkung des hemmenden Faktors, der aus dem Tegument der Königin gewonnen werden kann. Auf Filterpapier dargeboten lösen diese Tegumentextrakte ein charakteristisches Verhalten der Arbeitsbienen aus (Antennenbewegungen, Strecken des Rüssels). Die Reizung der Antennen, die mit der oralen Aufnahme des Ektohormons verbunden ist, scheint für die Hemmung der Ovarialentwicklung bei Arbeitsbienen notwendig zu sein.

Recherches sur le mécanisme de la rétraction du caillot et de la métamorphose visqueuse des plaquettes

Poursuivies depuis deux ans, nos recherches sur le mécanisme de l'adhésion des plaquettes *in vitro* nous ont montré que ce phénomène n'est possible qu'à condition que soient présents à la surface des plaquettes les facteurs nécessaires à la thrombinoformation[1]. La thrombine ne peut toutefois à elle seule déterminer la métamorphose visqueuse des plaquettes[2].

On sait d'autre part qu'adhésion des plaquettes *in vitro* et métamorphose visqueuse sont deux phénomènes si pas absolument identiques, du moins tributaires d'un même mécanisme[3]. Récemment, Lüscher a défini la métamorphose visqueuse des plaquettes comme l'ensemble des phénomènes qui aboutissent à la rétraction du caillot[4]. Cet auteur a établi que deux substances sont indispensables pour permettre la rétraction du caillot: la thrombine et un cofacteur plasmatique dialysable, cofacteur dont il a défini un certain nombre de propriétés physicochimiques[5].

Nous avons réalisé un certain nombre d'expériences sur le mécanisme de la rétraction du caillot, dont nous décrivons sommairement ici les premiers résultats.

Technique. Nous avons utilisé les réactifs suivants:

Plaquettes humaines lavées 4 fois en tampon véronal-acétate de pH 7,39, additionné d'1/10 de son volume de complexion III (tétraéthylène diamine acétate) à 1%. Après lavages, les plaquettes sont remises en suspension tantôt en tampon, tantôt en NaCl aq. à 0,9% de pH 7,4, et leur concentration est ajustée à 800 000 éléments par mm³. Ces plaquettes sont utilisées fraîches ou après conservation de 24 h à 4° C.

Thrombine humaine préparée selon Biggs et Macfarlane[6], et utilisée à une concentration telle que 0,1 cm³ coagule en 11 s à 37° C 0,1 cm³ de fibrinogène à 500 mg%.

Fibrinogène Roche d'origine bovine, en solution en NaCl aq. à 0,9%, à la concentration de 500 mg%.

Tampon véronal-acétate de pH 7,39.

Tampon Na_2HPO_4-KH_2PO_4 de pH 7,4.

Dialysats de plasma humain préparés par dialyse de 24 h à 4° C à travers cellophane de 10 cm³ de plasma humain oxalaté contre 10 cm³ de NaCl aq. à 0,9% de pH 7,4.

Dans un tube de 0,6 cm de diamètre flambé préalablement au rouge et refroidi, nous ajoutons successivement 0,1 cm³ de la suspension de plaquettes, 0,1 cm³ de la solution de fibrinogène, 0,2 cm³ des substances étudiées et 0,1 cm³ de thrombine. Les tubes sont incubés à 37° C et la rétraction est exprimée en pour-cent de la longueur totale selon Fonio[7].

Résultats. Nous avons pu observer les faits suivants:

1° Le mélange plaquettes humaines, fibrinogène et thrombine donne un caillot non rétractile.

2° L'adjonction au mélange précité de dialysat donne un caillot rétractile. Le pour-cent de rétraction est, tout au moins dans certaines limites, proportionnel au logarithme de la concentration du dialysat. Nous confirmons ici un fait constaté par Lüscher[8].

3° La substitution au dialysat de glucose, à des concentrations finales allant de 20 à 2000 γ/cm³, nous a donné un caillot parfois rétractile, la plupart du temps non rétractile.

4° L'adjonction de tampon véronal acétate au glucose nous a toujours donné un caillot rétractile. Il en est de même pour le tampon phosphate. Dans ces expériences, glucose et dialysat sont parfaitement interchangeables.

5° Dosant le glucose dans divers dialysats, nous avons constaté que ceux-ci sont plus actifs sur la rétraction du caillot pour une concentration déterminée de glucose que cette substance pure, le phénomène étant étudié en présence de tampon véronal acétate.

6° En présence de tampon véronal acétate ou de tampon phosphate seuls, le caillot, dans la majorité de nos expériences, s'est rétracté. L'adjonction de glucose à ces tampons a provoqué deux phénomènes: une rétraction accélérée et une rétraction plus complète. Le glucose n'est alors nécessaire qu'à l'état de trace, quelques γ/cm³ pour entraîner une rétraction complète.

7° La thrombine humaine préparée par nous a toujours entraîné, lorsqu'elle était ajoutée à une suspension de plaquettes humaines en suspension en NaCl aq. à 0,9%, une agglutination de ces éléments. L'examen microscopique nous a montré la fusion des thrombocytes en masses amorphes de petite dimension, réalisant ainsi des images de métamorphose visqueuse telles que les ont décrites Wright et Minot[9]. Ce phénomène est inhibé par l'adjonction de citrate sodique, et la recalcification ultérieure permet de faire apparaître à nouveau l'agglutination. L'oxalate de soude n'a pas cette propriété inhibitrice, cependant que le complexion III agit comme le citrate.

8° Une suspension concentrée de plaquettes humaines en NaCl aq. à 0,9% (2 500 000 éléments/mm³) montre une agglutination microscopique si on y ajoute de la thrombine. Si en outre, on additionne au tube en expérience du tampon véronal acétate ou du tampon phosphate, on assiste à la formation d'un «caillot plaquettaire» rétractile. Le pouvoir rétractile de ce caillot

[1] Y. Bounameaux, C. r. Soc. biol. *149*, 817, 1059, 1285 (1955); I. Sympos. Fondat. Baldaeci, Omnia Medica, éd. Pise (Madrid 1955).

[2] Y. Bounameaux, Arch. int. Physiol. Bioch. *63*, 531 (1955).

[3] O. E. Budtz-Olsen, *Clot retraction* (Blackwell, Oxford 1951). – R. Feissly, V. Congrès Soc. Europ. Hématol. Fribourg (1955).

[4] E. F. Lüscher, Schweiz. med. Wschr. *86*, 345 (1956).

[5] E. F. Lüscher, Schweiz. med. Wschr. *86*, 345 (1956); Vox sanguinis (sous presse).

[6] R. Biggs et R. G. Macfarlane, *Human Blood Coagulation* (Blackwell, Oxford, 1953).

[7] A. Fonio, Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. *4*, 1 (1953).

[8] E. F. Lüscher, Vox sanguinis (soos presse).

[9] J. H. Wright et G. R. Minot, J. exp. Med. *26*, 393 (1917).

est encore accru par l'adjonction de glucose à la concentration finale de 200 γ/cm^3, cet élément seul étant totalement inactif. Le mélange plaquettes, thrombine, dialysat, donne également un caillot rétractile comme il a été précédemment établi[8].

De ces expériences, il ne nous paraît pas encore possible de tirer de conclusion définitive.

Remarquons tout d'abord que nos réactifs, fibrinogène et surtout thrombine, ne peuvent être considérés comme des corps chimiquement purs. Il en est de même des plaquettes dont on sait qu'elles sont entourées par une atmosphère plasmatique[10]. La multiplication jusqu'à huit des lavages de ces éléments n'a cependant pas modifié nos résultats.

Nous constatons qu'en présence de tampon véronal acétate ou phosphate, glucose pur et dialysat ont une action qualitativement, mais non quantitativement identique. En l'absence de ces tampons, l'inactivité habituelle du glucose s'oppose à l'action constante du dialysat. Ainsi-donc, si le glucose représente un des éléments actifs du dialysat, il n'agit certainement pas seul.

L'imparfaite reproductibilité de certaines de nos expériences, dépendant peut-être d'une purification variable de la thrombine, nous impose encore une certaine prudence dans l'interprétation de nos résultats. Il nous paraît cependant certain que la rétraction du caillot soit sous la dépendance du catabolisme du glucose. Le KCN exerce d'ailleurs une action inhibitrice totale sur la rétraction du caillot à la concentration de $2 \cdot 10^{-3}$, partielle à $2 \cdot 10^{-4}$.

En résumé, nous confirmons que la rétraction du caillot résulte de l'interaction de la thrombine et d'un facteur dialysable. Nous montrons que dans certaines circonstances, le glucose agit comme le facteur dialysable. La rétraction du caillot nous paraît dépendre du catabolisme du glucose.

Y. Bounameaux[11]

Laboratoire pour l'étude de la coagulation sanguine Clinique médicale de l'Université, Zurich, le 6 juillet 1956.

Summary

The concept, that viscous metamorphosis of platelets and clot retraction is initiated by thrombin and a dialyzable factor was confirmed. Under certain circumstances glucose acts as dialyzable factor. Clot retraction seems to depend upon the catabolism of glucose.

[10] J. Roskam, Arch. int. Physiol. *20*, 241 (1923). – Y. Bounameaux, Arch. int. Physiol. Bioch. *63*, 531 (1955).

[11] Chargé de recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique de Belgique.

Adrenalin- und Noradrenalinbestimmungen im Blutplasma unter der Geburt

Untersuchungen von Kaiser und Harris[1] und später von Kaiser[2] über den Einfluss von *L*-Adrenalin- und *L*-Noradrenalin-Infusionen auf die Wehentätigkeit ergaben eine rasch vorübergehende Abschwächung durch Adrenalin, anderseits ein Ansteigen der Wehenfrequenz und des Tonus ohne Zunahme der Amplitude nach Noradrenalin. Boesch[3] konnte diese mit externer Tokodynamometrie erhaltenen Ergebnisse mit simultaner, kontinuierlicher Amniondruckmessung nach einer intravenösen Noradrenalindauertropfinfusion bestätigen und erhielt bei entsprechender Erhöhung der Tropfenzahl eine starke Erhöhung der Amplitude und Vermehrung der Wehenfrequenz bis zum Wehensturm.

Das Bild der Wehenschwäche entspricht in gewisser Hinsicht jenem, welches durch Adrenalinzufuhr hervorgerufen werden kann. Freiwerden von körpereigenem Adrenalin unter der Geburt, besonders als Folge einer emotionellen Stresswirkung bei ängstlichen und sehr schmerzempfindlichen Patientinnen, könnte somit als Grund einer krampfartigen Wehentätigkeit mit protrahierter Geburtsdauer oder einer Wehenschwäche in Frage kommen. C. Garcia und E. Garcia[4] gelang es, mittels einer biologischen Methode bei langdauernder und schmerzhafter Wehentätigkeit («prolonged and painful labor») und besonders bei Wehenschwäche, im Gegensatz zu Patientinnen mit normaler Wehentätigkeit, eine signifikant erhöhte Adrenalin-Konzentration im Plasma nachzuweisen.

Diese Beobachtungen und Überlegungen veranlassten uns, die Katecholamine unter der Geburt im Blutplasma zu bestimmen. Wir verwendeten dazu die fluorometrische Methode von Weil-Malherbe und Bone[5], modifiziert nach Kaegi und Burger[6], und erhielten folgende Werte:

Nr.	Alter Jahre			*A*	*NA*	%*A*
1	31	V.–p.	wehenlos am Termin	1,58	3,74	30
2	32	IV.–p.	wehenlos am Termin	0,91	2,05	31
3	30	II.–p.	Kontraktionen 3 Tage vor Spontangeburt	0,95	1,32	42
4*	22	I.–p.	hohe Wehenfrequenz schmerzhafte Wehentätigkeit	3,38	4,06	45
5	25	I.–p.	Beginn der normalen Eröffnungsperiode	0,39	1,67	19
6	22	I.–p.	Beginn der normalen Austreibungsperiode	0,23	2,60	8
7	26	II.–p.	Präeklampsie, Blutdruck 165/120, unter Reserpin (Serpasil)	0,80	1,04	43
8	Mittlerer Normalwert, das heisst Durchschnitt von etwa 20 Männern und Frauen			0,4	2,2	15

I.–p. = primipara usw.; *A* = Adrenalin, in ng/ml (10^{-9} g/ml); *NA* = Noradrenalin, in ng/ml (10^{-9} g/ml); %*A* = Adrenalin der Gesamtkatecholamine.

* Bei dieser Bestimmung wurde die Methode in einer Einzelheit abgeändert, so dass wir höhere Werte für *A* und *NA*, jedoch dasselbe Verhältnis *A*/*NA* erhielten.

Der Adrenalinanteil an den Gesamtkatecholaminen unter der Geburt bei normaler Wehentätigkeit entspricht etwa demjenigen von normalen, nichtschwangeren Versuchspersonen. Bei Patientinnen ohne oder mit

[1] I. H. Kaiser und J. S. Harris, Amer. J. Obstetr. Gynec. *59*, 775 (1950).

[2] I. H. Kaiser, Surg. Gynec. Obstetr. *90*, 649 (1950).

[3] K. Boesch, Dissertation Basel 1954.

[4] C. R. Garcia und E. S. Garcia, Amer. J. Obstetr. Gynec. *69*, 812 (1955).

[5] H. Weil-Malherbe und A. D. Bone, Biochem. J. *51*, 311 (1952)

[6] J. Kägi und M. Burger (in Vorbereitung).

nur schwacher Wehentätigkeit am Termin ist der Adrenalinanteil mit etwa 34% deutlich erhöht. Bei einer Patientin mit schmerzhafter, krampfartiger Wehentätigkeit und langsamem Geburtsfortschritt war er 45%.

Fall 1–6 hatten einen normalen Blutdruck.

Der niedere Noradrenalinwert bei Fall 7 kann zum Teil auf die Reserpinwirkung zurückgeführt werden (Burger[7]).

Obwohl wir nur über wenige Versuche berichten können, halten wir diese vorläufige Mitteilung für berechtigt, da die Resultate unseren Erwartungen entsprechen. Die Bestimmungen sollen an grösseren Versuchsreihen unter der Geburt durchgeführt werden.

E. Hochuli, O. Kaeser und M. Burger

Frauenklinik des Kantonsspitals St. Gallen und Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, den 2. Juli 1956.

Summary

The % adrenaline from the total catecholamines in blood plasma of women under prolonged labor is higher than in plasma of women under normal labor or in healthy adults.

[7] M. Burger, Helv. physiol. Acta *14*, C 13 (1956).

Action pancréatotrope de la carnitine

La présence de carnitine dans différents extraits pancréatiques (extrait lipocaïque du type Entenman[1]), vagotonine[2] et le fait que la Bicarnésine[3] (carnitate de carnitine de synthèse[4]) provoque comme monomère une excitation de la sécrétion exocrine du pancréas[5] nous ont incités à rechercher la présence de carnitine dans la sécrétion pancréatique externe normale (stimulée par Sécrétine) et dans la sécrétion pancréatique externe stimulée par Bicarnésine (essais sur chien).

La méthode de dosage utilisée est la méthode gravimétrique au sel de Reinecke que nous avons déjà décrite[6]. Les résultats obtenus montrent que, non seulement le suc pancréatique normal est très riche en carnitine, mais que, tout en provoquant une stimulation de la sécrétion pancréatique externe, l'injection intraveineuse de Bicarnésine chez le chien entraîne un accroissement important de la teneur en carnitine de cette sécrétion.

Non seulement la teneur en carnitine du suc pancréatique stimulé par Bicarnésine augmente de 68% par rapport à celle du suc pancréatique stimulé par Sécrétine, mais le suc stimulé par Bicarnésine est de 46% plus concentré que le suc stimulé par Sécrétine.

Ces faits laissent supposer que l'effet de la Bicarnésine sur le fonctionnement pancréatique n'est pas uniquement dû à une stimulation générale du système nerveux parasympathique[7], mais est également vraisemblablement lié à une fonction physiologique privilégiée de la carnitine dans le pancréas lui-même. La vérification de l'action pancréatique de la Bicarnésine chez l'homme[8] prend ainsi une signification plus importante et pose la question du rôle métabolique de la carnitine dans la cellule pancréatique exocrine et endocrine.

Suc pancréatique externe	Obtenu après stimulation par la Sécrétine	Obtenue après stimulation par la Bicarnésine
Teneur en matières sèches	2,84%	5,34%
Carnitine totale . .	0,41 g/100 ml	0,69 g/100 ml
Choline	0,092 g/100 ml	0,028 g/100 ml

F. Binon et G. Deltour

Laboratoire de Recherches, Société des Laboratoires Labaz, Bruxelles, le 2 juillet 1956.

Summary

Pancreatic exocrine secretion in dogs—either normal or induced by dicarnitine—contains high amounts of carnitine. This finding suggests that the biological action of dicarnitine might not only occur through the parasympathetic system but might also be due to a more specific action of carnitine itself.

[1] F. Binon, Voeding *16*, 781 (1955).
[2] F. Binon et G. Deltour, C. r. Soc. Biol. *149*, 932 (1955).
[3] Marque déposée par la Société des Laboratoires Labaz.
[4] G. Dechamps, Ng. Ph. Buu-Hoï, H. le Bihan et F. Binon, C. r. Acad. Sci. *238*, 826 (1954).
[5] R. Charlier, Arch. int. Pharmacodyn. *98*, 251 (1954); *106*, 184 (1956).
[6] F. Binon, Voeding *16*, 781 (1955). – F. Binon et G. Deltour, C. r. Soc. Biol. *149*, 932 (1955).
[7] R. Charlier, Arch. int. Pharmacodyn. *98*, 251 (1954); *106*, 184 (1956); C. r. Soc. Biol. *149*, 934 (1955).
[8] P. Aubert, J. André, M. J. Dallemagne et E. Philippot, Thérapie, 1956 (sous presse).

PRO LABORATORIO

Millivoltmeter

Es soll im folgenden eine elektronische Apparatur zur Messung kleiner Gleichspannungen beschrieben werden. Sie zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit (1 Skalenteil/mV), hohen Innenwiderstand, gute Stabilität und ein einfaches Funktionsprinzip aus.

Die Apparatur umfasst zwei Geräte: ein Millivoltmeter (Discriminator) und eine Kompensationsspannungsquelle (Compensator). Der Compensator wird nur benötigt, wenn der Innenwiderstand der zu messenden Gleichspannungsquelle (zum Beispiel biologisches Objekt) über 2×10^5 Ohm beträgt, in welchem Falle der Discriminator als empfindliches Nullinstrument arbeitet.

Der Discriminator. Abbildung 1 zeigt das Prinzipschema des Discriminators. Es besteht aus einer Widerstands-Brückenschaltung mit der Speisespannung U_s und dem Anzeigeinstrument A (Zeiger in der Mitte). Zwei Arme der Brücke bestehen aus Ohmschen Widerständen (R_1, R_2), die beiden anderen aus gittergesteuerten Elektronenröhren (V_1, V_2). Der Eingang ist symmetrisch. Wird mit dem Compensator gemessen, so ist nach Nullabgleich das Messobjekt *gänzlich unbelastet*. Bei direkter Spannungsablesung ohne Compensator ist das Messobjekt mit dem Widerstand $W_1 + W_2$ und einem Bruchteil des Differenzgitterstromes der beiden Röhren V_1 und V_2 belastet. Die Eichung erfolgt asym-

metrisch mit Hilfe des Compensators. Das gleiche Klemmenpaar dient zur Widerstandsmessung.

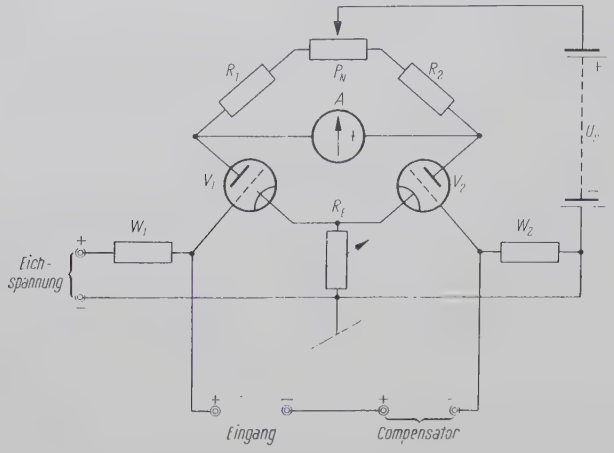


Abb. 1. Prinzipschema des Discriminators.

$R_1 = R_2$ Brückenwiderstände; $V_1 = V_2$ Elektronenröhren; $W_1 = W_2$ Gitterableitwiderstände; R_E Eichwiderstand; P_N Nullpunkts-Potentiometer; A Anzeigeinstrument; U_s Speisespannung.

Abbildung 2 zeigt das ausführliche Schaltschema des Discriminators I 1644. Die beiden Röhren sind in einer Doppel-Endpentode zusammengefasst, die von der Herstellerfirma auf Symmetrie ausgesucht ist (Typ 1644, entspricht dem Normaltyp 12L8GT). Die negative Gittervorspannung beträgt etwa 13 V, so dass die Röhren am Anfang des unteren Kennlinienknicks arbeiten. Der Shunt des Anzeigeinstruments ist so ausgebildet, dass der Brückenwiderstand in jeder Stellung gleich dem Instrumentwiderstand ist, was für die Eichung wünschbar ist. Zur Grobregelung des Nullpunktes dient der Regelwiderstand N und zur Feinregelung das Potentiometer «Nullpunkt». Der Bezugspunkt für die Ablesung kann auf einen beliebigen Skalenpunkt verlegt werden, bei Benutzung des Compensators sogar ausserhalb der Skala. Der Taster «Gitterwechsler» erlaubt, den Nullabgleich vorzunehmen, ohne dass der Zeiger auf Skalenteil «null» zeigt.

Bei asymmetrischem Eingang in Serie zum Gitterwiderstand (Klinke «+ Eichspannung») ist ein Gitterstrom von etwa 2×10^{-8} A wirksam. Bei asymmetrischem Eingang parallel zu beiden Gitterwiderständen plus Siebwiderständen in Serie (Klinken «+ Eingang –») muss man zwischen unkompensierter und kompensierter Messung unterscheiden. Im ersten Fall ist das Messobjekt mit den oben erwähnten Widerständen und höchstens mit einem Viertel des Differenzgitterstromes der beiden Pentoden in der Grössenordnung von 10^{-9} A belastet. Wenn nämlich das zum negativen Eingangspol führende Gitter den um den Betrag ΔI_g höheren Gitterstrom führt als das andere, so beträgt der Kurzschlussstrom des Eingangs

$$I_0 = \frac{1}{4} \Delta I_g \tag{1}$$

und damit die Spannungsanzeige des Instruments A

$$U_A = -\frac{1}{4} \Delta I_g \cdot 2 \cdot 10^6 . \tag{2}$$

Man erhält den Differenzgitterstrom nach Wert und Richtung aus der Ablesung am Instrument (ohne Betätigung des Gitterwechslers) zu

$$\Delta I_g = -2 \cdot 10^{-6} U_A . \tag{3}$$

Die Leerlaufspannung am (offenen, stromlosen) Eingang beträgt

$$U_0 = 10^6 \Delta I_g , \tag{4}$$

Gleichung (3) eingesetzt ergibt

$$U_0 = -2 U_A . \tag{5}$$

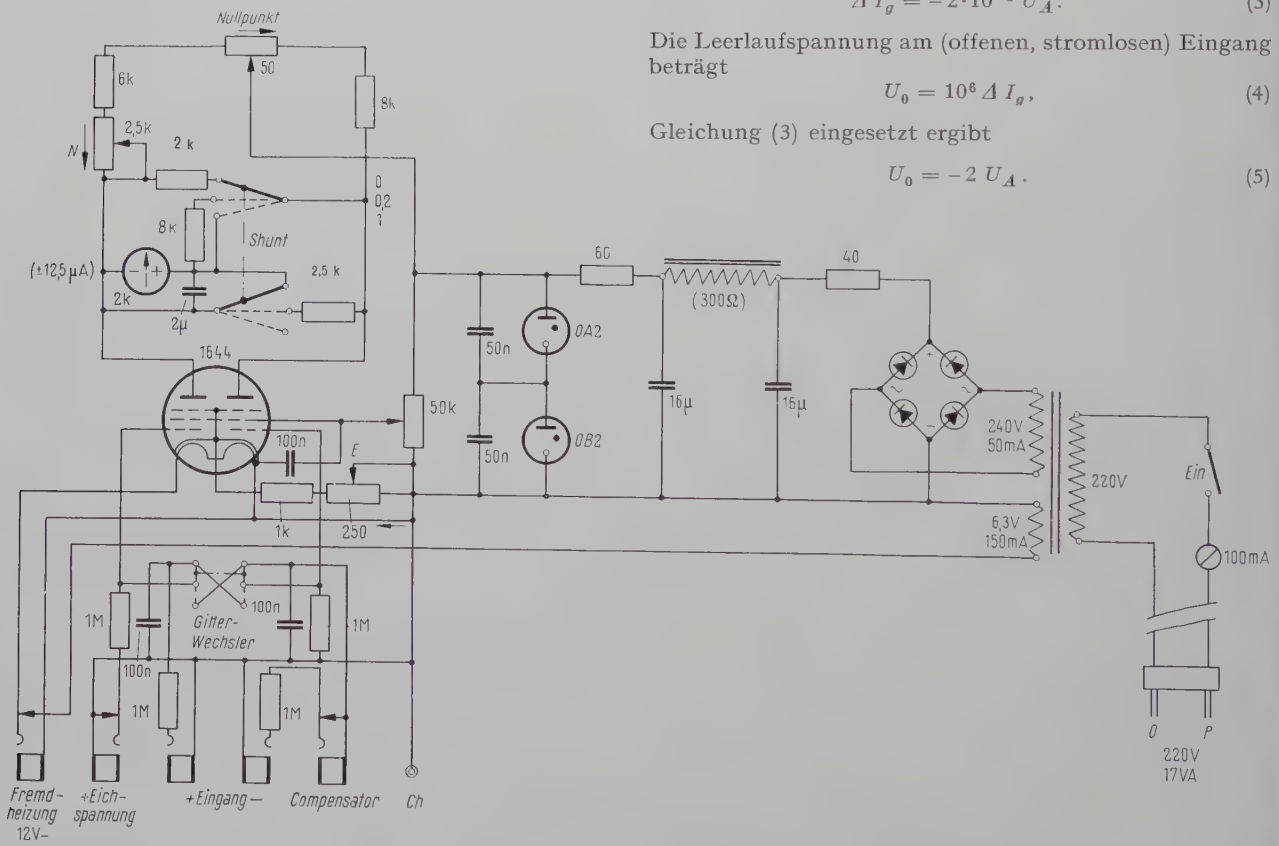


Abb. 2. Schema des Discriminators I 1644. Widerstände in Ohm, Kapazitäten in Farad (keine Elektrolytkondensatoren). $n = 10^{-9}$, $\mu = 10^{-6}$, $m = 10^{-3}$, $k = 10^3$, $M = 10^6$. Pfeilrichtung bei Potentiometern bedeutet Rechtsdrehung.

Bei kompensierter Messung fliesst kein Strom, und die unbekannte Spannung am Messobjekt beträgt

$$U_x = U_0 - U_C , \tag{6}$$

wenn U_c die nach Abgleich am Compensator abgelesene Spannung bedeutet. Gleichung (5) eingesetzt ergibt

$$\boxed{U_x = -(U_C + 2\,U_A) .} \tag{7}$$

In diese Formel sind die beiden Spannungen nach Wert und Vorzeichen einzusetzen. Das resultierende Vorzeichen der unbekannten Spannung bezieht sich dann auf die angeschriebene Polarität des Eingangs.

Das Fliessen von Gitterstrom bei asymmetrischem Eingang ermöglicht eine Messung von hochohmigen Widerständen. Der unbekannte Widerstand wird dazu an die Klinke «+ Eichspannung» angeschlossen und «Shunt» auf 0,2 gestellt. Der Gitterstrom erzeugt am Widerstand einen Spannungsabfall, welch letzterer vom Discriminator direkt in mV angezeigt wird. Dieser Ausschlag wird mit jenem verglichen, den man bei Anschalten eines bekannten Vergleichswiderstandes erhält. Stört die Eigenspannung von Mikroelektroden die Messung, was durch Umpolen festgestellt werden kann, so ist zunächst, wie oben beschrieben, die Spannung zu messen. Daraufhin wird der Compensator in Serie zur Mikroelektrode geschaltet, und es wird an diesem eine gleichgrosse Spannung mit entgegengesetztem Vorzeichen eingestellt.

Da sich der Wert des Gitterstromes in Funktion des Gitterwiderstandes geringfügig ändert, muss eine Eichkurve aufgenommen werden, wenn man nicht nur die Grössenordnung des unbekannten Widerstandes ermitteln will. Um den für die Messung von Mikroelektroden günstigen Bereich von 0,5...10...200 MΩ zu erhalten, benötigt man einen regelbaren Zusatzwiderstand von etwa 10 MΩ. Dieser wird in die Klinke «+ Eingang» gesteckt und verbindet somit das Gitter der Röhre V_1 mit Erde. Bei geschlossener Klinke «+ Eichspannung» wird zuerst das Instrument auf – 20 mV eingestellt (Nullpunkt der Widerstandsskala), und nach Öffnen dieser Klinke wird unter Veränderung des Zusatzwiderstandes der Ausschlag auf + 20 mV gebracht (∞-Punkt der Widerstandsskala).

Der Compensator. Abbildung 3 zeigt das Prinzipschema eines batteriegespiesenen Compensators. Ein geeichter Spannungsteiler P, zweckmässig als Stufendekade ausgebildet, wird von einem konstanten Strom I_N aus der Batterie U_B durchflossen, so dass bekannte, konstante Spannungen abgreifbar sind. Zum Eichen des Compensators wird sein Teiler P auf 0 gestellt und ein hochohmiger Gleichspannungszeiger (Katodenstrahloszillograph oder Discriminator) am Ausgang A angeschlossen. Zur Schonung des Normalelementes wird die Eichtaste T_E nur kurzzeitig gedrückt und mit Hilfe von R_E auf Spannung «null» abgeglichen.

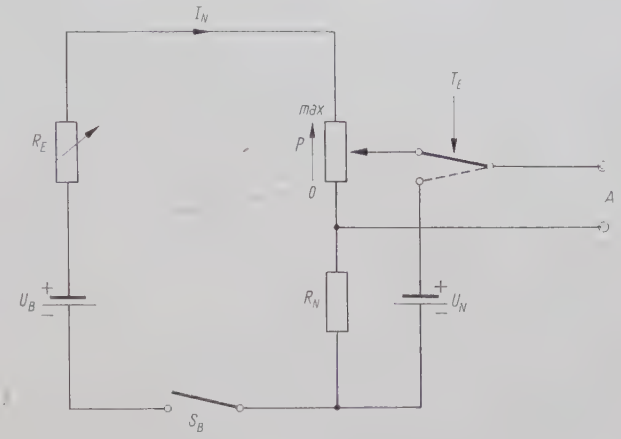


Abb. 3. Prinzipschema des Compensators.

U_B Speisebatterie; U_N Normalelement; R_E Eichregler; R_N Normalwiderstand; P geeichtes Stufenpotentiometer; T_E Eichtaste; A Ausgang.

Schliesslich zeigt Abbildung 4 das ausführliche Schema des für physiologische Zwecke verwendeten Compensators B 4569 mit einem Bereich von 0... ± 210 mV ± 2% in Stufen von 1 mV.

E. DE GRUYTER

Hallerianum, Bern, den 26. März 1956.

Summary

Description of an electronic voltmeter. Calibrated ranges – 25... 0... + 25 mV and – 125... 0... + 125 mV, D. C. Input resistance infinitely high if used as a zero indicator. Possibility to measure resistors in the range 0·5... 200 MΩ.

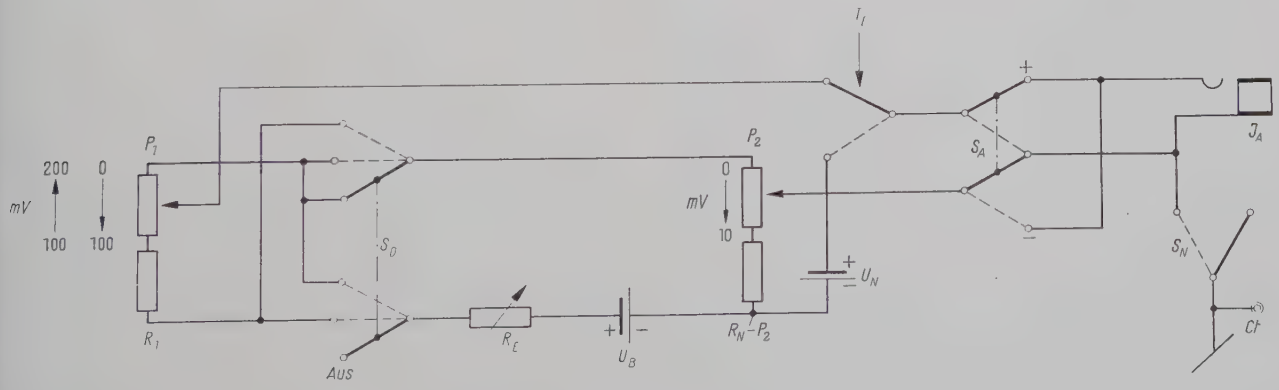


Abb. 4. Schema des Compensators B 4569.

U_E Speisebatterie 1,5 V (Hellesens, Typ Uncle); U_N Normalelement 1,0185 V ± 0,3‰ (Philips Typ GM 4569); R_1 1 kΩ ± 1% (100 mV); R_N–P_2 10085 Ω ± 0,5%; R_E 2,2 kΩ fest + 1 kΩ; 5 W variabel; P_1 10×100 = 1000 Ω ± 1% (0...100...200 mV); P_2 10×10 = 100 Ω ± 1% (0...10 mV); S_D Dekaden-, kombiniert mit Ausschalter mit den 3 Stellungen «Aus», «bis 110 mV», «bis 210 mV»; S_A Schalter für die Polarität des Ausgangs; S_N Schalter für den Null-Leiter, an Chassis zu legen; T_E Eichtaste; J_A Ausgangsklinke; Ch Buchse zum Erden des Chassis.

Über Inhaltsstoffe aus *Petasites officinalis* Moench

I. Petasin und die Petasolester B und C

Die Pestwurz (*Petasites officinalis* Moench), die seit dem Altertum als Heilpflanze gebraucht wird, ist trotz angeblich günstigen Wirkungen bei verschiedenen Krankheiten[1] bis vor kurzem weder pharmakologisch noch chemisch genauer untersucht worden. 1951 wurde von Bucher[2] darauf hingewiesen, dass ein Extrakt aus den Rhizomen eine spasmolytische Wirksamkeit besitze, die vermutlich auf ein im Vergleich mit Papaverin aktiveres Prinzip zurückzuführen sei. Diese Beobachtung gab den Anstoss zur chemischen Bearbeitung dieser Droge.

Am Zürcher Chemie-Kongress (Juli 1955) berichteten wir[3] erstmals über die Isolierung von zwei kristallinen, spasmolytisch wirksamen, stickstoffreien Verbindungen der Zusammensetzung $C_{20}H_{28}O_3$ (Smp. 96–98°) und und $C_{19}H_{26}O_3S$ (Smp. 136–138°). Sie konnten aus den in Petroläther löslichen Anteilen eines Extraktes der Rhizome nach Chromatographie an Aluminiumoxyd isoliert werden und erwiesen sich als Ester, die bei der alkalischen Hydrolyse einen Alkohol $C_{15}H_{22}O_2$ (Smp. 124–126°) und Angelica-, bzw. β-Methylmercapto-acrylsäure lieferten.

Unabhängig von unseren Untersuchungen wurde kurz darauf von Büchi und Mitarbeitern[4] über die Isolierung eines genuinen, stark spasmolytisch wirkenden Inhaltsstoffes aus Petasites berichtet. Diese *Petasin* genannte Substanz (Smp. 65–68°), der die Zusammensetzung $C_{20}H_{28}O_3$ zukommt, lagerte sich mit verdünnter HCl oder Aluminiumoxyd in ein weniger wirksames Isomeres, das iso-Petasin (Smp. 95–96°), um. Die Eigenschaften der Isoverbindung deuteten auf die Identität mit unserem schwefelfreien Ester hin. Bei der alkalischen Spaltung wurde sowohl aus dem Petasin als auch aus dem iso-Petasin ein Abbauprodukt (Smp. 122–123°), dem die Formel $C_{16}H_{24}O_2$ zugeschrieben wurde, neben Aceton und Ameisensäure[5] erhalten. Unterschiede im IR-Spektrum deuteten darauf hin, dass nur im Petasin, aber nicht in seinem Umlagerungsprodukt iso-Petasin eine endständige Methylengruppe vorhanden sei. Aus Petasin und iso-Petasin konnten als charakteristische Derivate zwei verschiedene Mono-2,4-dinitrophenylhydrazone dargestellt werden.

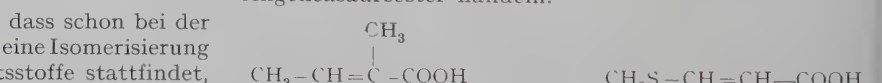
Wir berichten im folgenden kurz über den Fortgang unserer eigenen Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der Petasites-Rhizome.

Nachdem festgestellt worden war, dass schon bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd eine Isomerisierung der spasmolytisch wirksamen Inhaltsstoffe stattfindet, haben wir diese Methode verlassen und für die Trennung der Wirkstoffe eine Verteilung zwischen Lösungsmitteln (Petroläther-Methanol-Wasser) vorgenommen. Es gelang uns dabei, ausser dem von Büchi[4] isolierten Petasin noch 2 weitere kristallisierte Produkte zu fassen, die wir Petasolester B und Petasolester C nennen. Einige physikalische Eigenschaften dieser Verbindungen sind in Tabelle I mit denjenigen der Isomerisierungsprodukte und einiger Abbauprodukte zusammengestellt.

Petasin (Smp. 66–70°), das Hauptprodukt, ist mit der früher beschriebenen Verbindung[4] nach Mischschmelzpunkt, Drehung, Analyse, UV- und IR-Spektren identisch[6]. Es bildet sehr leicht ein Mono-2,4-dinitrophenylhydrazon und nimmt bei der Hydrierung mit Platin in Eisessig 4 Mol H_2 auf. Kurze Behandlung mit Kalilauge in wässerigem Dioxan bei Siedetemperatur oder 12tägiges Stehen mit Kaliumhydrogencarbonat in wässerigem Methanol bei 20° oder auch schon Chromatographie an neutralem Aluminiumoxyd führen zur Bildung des isomeren iso-Petasin, das auch Büchi und Mitarbeiter beschreiben und das mit unserer früher erwähnten Verbindung $C_{20}H_{28}O_3$ identisch ist. Diese Isoverbindung verbraucht bei der Hydrierung mit Platin in Eisessig ebenfalls 4 Mol H_2. Wie das Petasin, so besitzt auch das iso-Petasin noch eine Carbonylgruppe, die mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagiert[4]. Die Bildung des Hydrazons (vgl. Tab. III) erfolgt allerdings nicht so leicht wie bei der genuinen Verbindung.

Petasin und seine Isoverbindung lassen sich mit wässeriger alkoholischer Kalilauge in einen neutralen und einen sauren Anteil spalten. Aus dem Neutralteil lässt sich ein Alkohol – wir nennen ihn *iso-Petasol* –, dem die Bruttoformel $C_{15}H_{22}O_2$ zukommt[7], gewinnen. Da der gleiche Alkohol auch aus der Isoverbindung erhalten wird, so findet unter den Bedingungen der Hydrolyse bereits Umlagerung statt, so dass der genuine Alkohol Petasol auf diesem Wege nicht gefasst werden kann. Iso-Petasol kann leicht zur Monoacetyl- oder Monobenzoylverbindung verestert werden, es reagiert immer noch mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (vgl. Tab. III) und nimmt bei der Hydrierung mit Platin in Eisessig 3 Mol H_2 auf.

Die saure Fraktion besteht zum überwiegenden Teil aus Angelicasäure (I*a*), daneben wird stets etwas Tiglinsäure (I*b*) gebildet. Sowohl die Titration mit Lauge als auch die papierchromatographische Verteilung deuten darauf hin, dass bei der alkalischen Hydrolyse nur diese beiden Säuren entstanden sind. Durch fraktionierte Sublimation lassen sich die Säuren rein gewinnen (vgl. Tab. II). Auch ihre *p*-Brom- oder *p*-Phenyl-phenacylester sind durch Chromatographie voneinander trennbar. Da sich der teilsynthetisch dargestellte Tiglinsäureester von iso-Petasol deutlich von iso-Petasin unterscheidet (vgl. Tab. I), muss es sich beim iso-Petasin um den Angelicasäureester handeln.



I*a cis*; I*b trans* II

Die Bruttoformel des Petasins ($C_{20}H_{28}O_3$) steht mit der Bildung von Angelicasäure ($C_5H_8O_2$) und iso-Petasol ($C_{15}H_{22}O_2$) im Einklang. Als Nebenprodukt konnten aber auch wir bei der alkalischen Hydrolyse in kleinen Mengen einen flüchtigen Neutralteil isolieren, dessen Dinitrophenylhydrazon mit Aceton-2,4-dinitrophenylhydrazon identifiziert werden konnte. Das Aceton ist deshalb als ein sekundäres Spaltprodukt des iso-Petasols anzusehen.

[1] Siehe zum Beispiel bei G. Madaus, *Lehrbuch der biologischen Heilmittel*, Abt. I, Heilpflanzen (Leipzig 1938), S. 2084.

[2] K. Bucher, Arch. exp. Path. Pharmak. *213*, 69 (1951).

[3] Vgl. A. Stoll, J. Renz und R. Morf, Referatenband, XIV. Internationaler Kongress für reine und angewandte Chemie, Zürich 1955, S. 203.

[4] A. Aebi, J. Büchi, T. Waaler, E. Eichenberger und J. Schmutz, Pharm. Acta Helv. *30*, 277 (1955).

[5] Nach einer mündlichen Mitteilung von Herrn Dr. Aebi konnte inzwischen festgestellt werden, dass die Bestimmung von 1 Mol Ameisensäure auf einem Irrtum beruht.

[6] Wir möchten Herrn Prof. Büchi auch an dieser Stelle für Proben von Petasin, iso-Petasin und deren C_{16}-Abbauprodukt bestens danken.

[7] Dieser Alkohol ist identisch mit dem von A. Aebi, J. Büchi, T. Waaler, E. Eichenberger und J. Schmutz, Pharm. Acta Helv. *30*, 277 (1955), aus Petasin erhaltenen C_{16}-Spaltprodukt.

Tabelle I

Eigenschaften der genuinen Ester, der Isoverbindungen und des iso-Petasols und seiner Derivate

Substanz	Summenformel	Schmelzpunkt °C	$[\alpha]_D^{20}$ in Chloroform [a] °C	UV-Maxima in Alkohol 95% (molare Extinktion)	
Petasin	$C_{20}H_{28}O_3$	66–70	+ 39,6	232 mμ (22600)	322 mμ (50)
Petasolester B	$C_{19}H_{26}O_3S$	134–136	+ 51,2	236 mμ (15900)	292 mμ (14900)
Petasolester C	$C_{19}H_{26}O_3S$	83–88	− 52,5	237 mμ (15800)	293 mμ (15400)
iso-Petasin	$C_{20}H_{28}O_3$	97–98	+ 30,1	243 mμ (14700)	280 mμ (7010)
iso-Petasolester B	$C_{19}H_{26}O_3S$	140–142	+ 45,6	248 mμ (14240)	290 mμ (23200)
iso-Petasol	$C_{15}H_{22}O_2$	124–126	+115,3	249 mμ (12700)	281 mμ (7650)
Acetylderivat von iso-Petasol	$C_{17}H_{24}O_3$	84–85	+ 78,5	246 mμ (11800)	280 mμ (6560)
Benzoylderivat von iso-Petasol	$C_{22}H_{26}O_3$	103–104	− 30,0	238 mμ (23000)	280 mμ (8070)
Tiglinsäureester von iso-Petasol	$C_{20}H_{28}O_3$	112–114	+ 4,9	243 mμ (13900)	280 mμ (6960)

[a] Die Drehungswerte der genuinen Ester, nicht aber ihrer Isoverbindungen, sind ungewöhnlich stark von der Reinheit der Substanzen abhängig.

Tabelle II

Säurekomponenten der Ester aus Petasites

Substanz	Summenformel	Schmelzpunkt °C	UV-Maxima in Alkohol 95% (molare Extinktion)	Schmelzpunkt des *p*-Bromphenacylesters °C	Schmelzpunkt des *p*-Phenylphenacylesters °C
Angelicasäure	$C_5H_8O_2$	39–41	217 mμ (7520)	62–64	86–87
Tiglinsäure	$C_5H_8O_2$	62–63	216 mμ (13300)	64–66	102–104
β-Methylmercaptoacrylsäure (*trans*?)	$C_4H_6O_2S$	138–141	272 mμ (19000)	110–111	

Tabelle III

Dinitrophenylhydrazone der Ester und des iso-Petasols

2,4-Dinitrophenylhydrazon von	Summenformel	Schmelzpunkt °C	UV-Maxima (molare Extinktion)				
			in Alkohol 95%			in Chloroform	
Petasin	$C_{26}H_{32}O_6N_4$	233–236	222 mμ (24300)	257 mμ (14600)	384 mμ (26400)	261 mμ (16800)	390 mμ (31000)
iso-Petasin	$C_{26}H_{32}O_6N_4$	153–155	222 mμ (31500)	257 mμ (18600)	397 mμ (30100)	263 mμ (17200)	404 mμ (29500)
iso-Petasolester B	$C_{25}H_{30}O_6N_4S$	118–120	224 mμ (22700)	292 mμ (22500)	398 mμ (28600)	294 mμ (22500)	405 mμ (29200)
iso-Petasol	$C_{21}H_{26}O_5N_4$	amorphes Pulver	225 mμ (18700)	260 mμ (17000)	397 mμ (28900)	264 mμ (15400)	403 mμ (28700)

Ausser dem Petasin konnten bei der Aufarbeitung der Petasites-Rhizome noch 2 weitere Substanzen isoliert werden, die besonders durch ihren Gehalt an Schwefel charakterisiert sind. Diese Verbindungen, die wir *Petasolester B* (Smp. 134–136°) und *Petasolester C* (Smp. 83–88°) nennen, besitzen beide die Summenformel $C_{19}H_{26}O_3S$ und lagern sich an neutralem Aluminiumoxyd in dieselbe isomere Verbindung, iso-Petasolester B (Smp. 140–142°), um. Der iso-Petasolester B ist mit unserer früher erwähnten Verbindung $C_{19}H_{26}O_3S$ (Smp. 136–138°) identisch. Durch alkalische Spaltung, die wie beim iso-Petasin durchgeführt wurde, konnte aus den schwefelhaltigen Verbindungen ebenfalls das iso-Petasol isoliert werden, während die bei der Hydrolyse anfallende saure Fraktion eine neue Säure enthält, die wir als β-Methylmercapto-acrylsäure (II) identifizieren konnten (Tab. II). Bei der Behandlung mit Mineralsäuren spaltet diese Säure Methylmercaptan ab und ihre Oxydation führt zu einem Sulfon, das zu einer Verbindung hydriert werden kann, deren Schmelzpunkt und Analyse mit der bekannten β-Methylsulfonpropionsäure[8] übereinstimmen. Ausgehend von der β-Chloracrylsäure konnte eine β-Methylmercaptoacrylsäure synthetisiert werden, die vermutlich die *trans*-Säure darstellt und die mit dem Abbauprodukt von Petasolester B und C identisch ist. Petasolester B und C unterscheiden sich wahrscheinlich nur durch *cis-trans*-Isomerie im Säureteil.

Sowohl das Petasin als auch die beiden Petasolester B und C leiten sich also vom selben C_{15}-Alkohol, dem Petasol, ab, der nach der alkalischen Spaltung nur in seiner iso-Form gefasst werden kann. Sie unterscheiden sich demnach nur in der mit diesem Alkohol veresterten Säurekomponente. Im IR-Spektrum der genuinen Ester und ihrer Isomeren lassen sich je 2 Carbonylbanden erkennen, von denen die kürzerwellige dem Estercarbonyl der betreffenden ungesättigten Säure zugeordnet werden kann, während die längerwellige zu einer ungesättigten Carbonylgruppe der Alkoholkomponente gehört.

[8] W. Schneider, Liebigs Ann. Chem. *375*, 207 (1910).

Tabelle IV

Relative spasmolytische Wirksamkeit[9] der genuinen Verbindungen aus *Petasites* und ihrer Umlagerungs- und Abbauprodukte

Substanz	Wirksamkeit Papaverin–HCl=100
Petasin[4]	1400
Petasolester B	480
Petasolester C	640
iso-Petasin	50
iso-Petasolester B	160
iso-Petasol	20

Die 3 genuinen Ester aus *Petasites officinalis* erwiesen sich als spasmolytisch wirksame Verbindungen. Nach der Isomerisierung geht die Wirksamkeit sehr deutlich zurück. In der Tabelle IV sind einige orientierende Werte über die Hemmung der Spontanmotilität am isolierten Kaninchendünndarm im Vergleich zu Papaverin-Hydrochlorid zusammengestellt.

A. Stoll, R. Morf,
A. Rheiner und J. Renz

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium, Sandoz AG, Basel, den 13. August 1956.

Summary

Three spasmolytically active substances which contain no nitrogen, namely petasin and the petasolesters B and C, were isolated from *Petasites officinalis* Moench. They are all esters of the same C_{15}-alcohol. Petasin is an ester of angelic acid, whereas the petasolesters B and C are derivates of a new acid containing sulphur, the β-methylmercapto-acrylic acid.

[9] Die Messungen wurden von Herrn Dr. Berde in unserer pharmakologischen Abteilung (Leitung Dr. A. Cerletti) ausgeführt.

THEORIA

Vierdimensionale Geometrie und ihre praktische Anwendung zur Erklärung kosmologischer Probleme*

Die mehrdimensionale Geometrie ist Allgemeingut aller Mathematiker. Umfangreiche Lehrbücher und sogar Romane sind darüber geschrieben worden. Merkwürdigerweise wird aber der mehrdimensionale Raum von den Physikern als ein rein theoretisches Gebilde angesehen, dem sie keine physische Realität zusprechen. Zwar wird das sogenannte Raum-Zeit-Kontinuum als vierdimensionale Realität angesehen, doch ist dies eben kein *Raum* im geometrischen Sinne, denn die Zeit ist qualitativ von der Länge verschieden. Der Zeit kann keine geometrische Eigenschaft, wie zum Beispiel Geradlinigkeit oder ein Verlauf senkrecht zu anderen Geraden zugeschrieben werden. Astrophysiker erkennen die Existenz eines gekrümmten und sich ausdehnenden Weltalls an und rechnen damit. Sie vermeiden jedoch den natürlichen Schritt, das gekrümmte Universum von endlicher Ausdehnung als eine in einem wirklichen, vierdimensionalen Raum eingebettete Hypersphäre anzusehen.

Forsyth[1] hat in seinem Lehrbuch der vierdimensionalen Geometrie gesagt: «Wenn man einmal fände, dass der objektive, dreidimensionale Raum tatsächlich die Eigenschaft der Krümmung besässe, ganz gleichgültig, wann und wie diese Eigenschaft durch Messung ermittelt würde, dann zwänge uns der mathematische Begriff der Krümmung notwendigerweise zur Erkenntnis der Existenz eines umfassenderen Raumes, auf den unser gekrümmter Raum bezogen werden könnte. Dieser weitere Raum wäre von grösserer dimensionaler Ausdehnung als das objektive, dreidimensionale Weltall.»

Die Evidenz der positiven Krümmung des Kosmos hat sich in den letzten Jahrzehnten so angehäuft (siehe zum Beispiel Hubble[2]), dass daran nur noch wenige zweifeln. Daher muss auch der vierdimensionale Raum als eine physische Realität anerkannt werden, obwohl er unseren beschränkten Sinnen verschlossen ist. An Hand eines Beispiels soll im folgenden dargestellt werden, dass die Annahme des vierdimensionalen Raumes als physisch-geometrischer Realität mit Erfolg zur Klarstellung eines sonst unverständlichen Phänomens verwandt werden kann. Nach der Behandlung jenes speziellen Problems soll angedeutet werden, dass auch andere, bisher widerspruchsvoll erscheinende Ergebnisse der modernen Physik vermutlich verstanden werden können, wenn man den vierdimensionalen Raum als eine unser dreidimensionales Weltall beherbergende Realität anerkennt.

Wir beginnen mit der starren Rotation der Spiralnebel. Babcock[3], Mayall und Aller[4] und Mayall[5] zeigten, dass mit Ausnahme des innersten, nicht aufgelösten Gebietes jede Emissionskondensation der Hauptscheibe eines Spiralnebels etwa die gleiche Winkelgeschwindigkeit aufweist, ganz unabhängig von ihrer Entfernung vom Mittelpunkt. Nur in den alleräussersten Gebieten herrscht Keplersche Bewegung. Andererseits haben McVittie und Payne-Gaposchkin[6] gezeigt, dass ein idealer, rotierender Barrennebel, wenn er auch nur für einen Augenblick existierte, sich spiralig aufwinden müsste, wenn er den Gesetzen der Mechanik gehorchte. Dieser Aufwindungsprozess sollte im Zentrum beginnen und sich allmählich nach aussen erstrecken, während die äusseren Teile der Arme Asymptoten zur ursprünglichen Längsachse des Barrens bleiben müssten. Dieses theoretisch postulierte Verhalten ist aber das genaue Gegenteil der beobachteten Struktur der Barrennebel, die häufig periphere Spiralstruktur und zentrale Starrheit aufweisen.

Lässt sich womöglich eine Erklärung der starren Rotation finden, wenn man einen Spiralnebel als dreidimensionalen Schnitt eines vierdimensionalen Gebildes auffasst? Es erhebt sich also die spezielle Frage: *Sind vierdimensionale geometrische Gebilde denkbar, die so geformt sind, dass ihre sukzessiven Schnitte mit dem sich ausdehnenden, dreidimensionalen Weltall eine Reihenfolge von Körpern liefern, welche mit aufeinanderfolgenden*

* Vorgetragen auf der Tagung der Sektion D (Astronomie) der American Association for the Advancement of Science, Atlanta, Georgia.

[1] A. R. Forsyth, *Geometry of Four Dimensions*, Vol. I (Cambridge 1930).

[2] J. Hubble, Astrophys. J. *84*, 517 (1936).

[3] H. W. Babcock, Lick Observ. Bull. *19*, 41 (1939).

[4] N. U. Mayall und L. H. Aller, Astrophys. J. *95*, 5, (1942); Lick Observ. Contr. [2] *1* (1942).

[5] N. U. Mayall, Publ. Obs. Univ. Michigan *10*, 19 (1950).

[6] G. C. McVittie und Cecilia Payne-Gaposchkin, Mon. Not. R. astr. Soc. *3*, 506 (1951).

Rotationsphasen existierender Nebel identifiziert werden können?

Im folgenden soll dieser Versuch gemacht werden.

Wenn man von seinen verschwommenen Umrissen absieht, so kann ein Spiralnebel als stereometrischer Körper (das heisst ein von Flächen begrenzter Teil des dreidimensionalen Raumes) aufgefasst werden. Als solcher kann er erzeugt werden durch einen Schnitt des dreidimensionalen Raumes S_3[7] durch einen vierdimensionalen Hyperkörper, das heisst durch eine Portion des vierdimensionalen Raumes S_4 begrenzt von dreidimensionalen Räumen.

Ein gewisser Hyperkörper, der um einen doppelten[8] helicoidalen Hyperzylinder als Grundfigur aufgebaut ist, ergibt die gewünschten Schnitte. Die Grundfigur (1) ist

$$\begin{aligned} w &= f(d) + k\alpha \\ x &= \pm d \cos \alpha \\ y &= \pm d \sin \alpha \\ z &= z \end{aligned} \qquad (1)$$

der geometrische Ort aller Geraden parallel zur Rotationsachse eines Nebels, die durch alle Punkte einer doppelten Schraubenfläche (Helicoid) gehen.

Wenn $f(d) = 0$, ergibt sich das Verhalten eines Barrennebels. Die Beschreibung dieses Falles wird der Kürze halber ausgelassen.

Die Grundfigur (1) kann zum Beispiel wie folgt gestaltet sein:

$$\begin{aligned} w &= md^2 + n\alpha \\ x &= \pm d \cos \alpha \\ y &= \pm d \sin \alpha \\ z &= z. \end{aligned} \qquad (2)$$

Der um diesen Grundraum aufgebaute Hyperkörper hat die Dicke der «Arme» eines Spiralnebels.

Querschnitte durch derartige oder ähnliche helicoidale Hyperzylinder sind die Grundfiguren von Spiralnebeln. Der Einfachheit halber werden $m = 1$ und $n = 1$ gesetzt. Daher wird, wie weiter unten ersichtlich, die Längeneinheit gleich dem Betrag der Verlängerung des Radius R des Weltalls S_3 während der Zeit, in der die Rotation des Nebels einen Winkelgrad beträgt.

Für unsere Betrachtung kann die Krümmung des Raumes in der Nachbarschaft eines helicozylindrischen Hyperkörpers vernachlässigt werden. Der Ursprung unseres Koordinatensystems ist der Schnittpunkt der Achse der helicoidalen Direktrix eines speziellen Hyperzylinders mit dem Weltall, in diesem Augenblick t_0.

Das Koordinatensystem besitzt vier aufeinander senkrecht stehende Achsen. Die w-Achse ist die Achse der helicoidalen Direktrix des Hyperzylinders. Sie ist eine Normale zum Weltall S_3. Sie verbindet den Mittelpunkt der Hypersphäre S_3 (im vierdimensionalen Raum) mit dem Mittelpunkt des Nebels. Es ergibt sich daher eine formale Analogie zum Weylschen Modell[9]. Die z-Achse ist die Polarachse des Nebels; und x- und y-Achsen liegen in der Äquatorialebene des Nebels.

[7] S – von dem lateinischen «spatium»

[8] Ein Querschnitt durch einen einfachen helicoidalen Hyperzylinder würde die Grundfigur eines einarmigen Nebels darstellen. Die doppelte Qualität jener Mannigfaltigkeit ist durch $\pm$-Zeichen ausgedrückt.

[9] H. Weyl, Physikal. Z. *24*, 230 (1923).

Der Schnitt des Grundraumes (2) mit dem Weltall S_3 zur Zeit t_0 kann gefunden werden, indem man $w = 0$ setzt. Das heisst, $0 = d^2 + \alpha$ oder $\alpha = -d^2$. Daher werden

$$\begin{aligned} x_0 &= \pm d \cos (-d^2) \\ y_0 &= \pm d \sin (-d^2) \\ z_0 &= z. \end{aligned} \qquad (3)$$

Dies ist ein spiraliger Zylinder mit geraden Generatoren, die der z-Achse parallel verlaufen. Seine Direktrix kann graphisch gefunden werden, indem man die Werte für x und y in (3) bestimmt. Diese Werte sind in Abbildung 1 durch runde Punkte dargestellt. Diese Kurve sieht in ihrer Gestalt den Armen eines Spiralnebels sehr

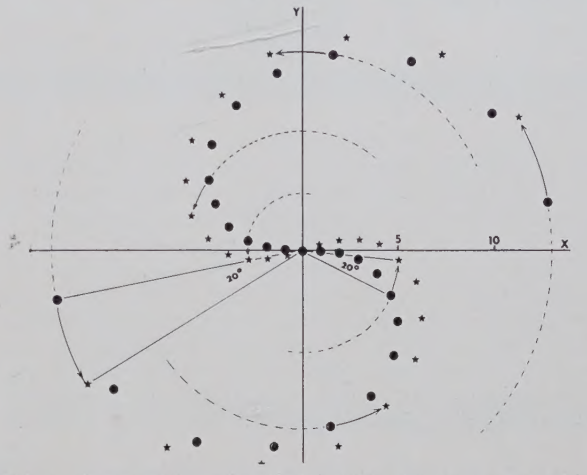


Abb. 1. Querschnitte durch die Direktrix des Grundraumes einer Hyperspirale (2) zur Zeit t_0 und zur Zeit t_{20}.

ähnlich. Zunächst ist der ganze spiralige Zylinder unendlich hoch in der z-Richtung. Jedoch sind die Nebel flache Linsen (Ort[10]). Daher wird als Grenzraum der ellipsoidale Hyperzylinder

$$\begin{aligned} z &= \sqrt{b^2 - b^2/r^2 \,(x^2 + y^2)} \\ w &= w \end{aligned} \qquad (4)$$

eingeführt. Er ist der geometrische Ort aller der w-Achse parallelen Geraden, die durch die Punkte der Oberfläche eines Ellipsoids gehen.

Der helicohyperzylindrische Raum bestimmt die Form der Arme des Nebels, während der ellipsoidale Hyperzylinder die Linsenform der Galaxie bestimmt. b ist die grösste Dicke (Länge der Polarachse) des Nebels, während r gleich dem Radius des starren Teils der Scheibe ist. Ein dreidimensionaler Schnitt des beschriebenen Hyperkörpers mit dem xyz-Raum ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

Wenn sich das Weltall ausdehnt, dehnt sich auch sein Radius aus. Zur Zeit t_{20} zum Beispiel ist dieser Radius $R_{20} = R_0 + 20$ lang geworden und $w = 20$. Daher ist

$$\begin{aligned} x_{20} &= \pm d \cos (20 - d^2) \\ y_{20} &= \pm d \sin (20 - d^2) \\ z_{20} &= z. \end{aligned} \qquad (5)$$

Tragen wir Werte für x_{20} und y_{20} in Abbildung 1 als kleine Sternchen ein, so sehen wir die Stellung der Arme des Nebels 20 Zeiteinheiten später. Die Pfeile in

[10] J. H. Oort, Astrophys. J. *116*, 233 (1952).

der Abbildung 1 ergeben die scheinbare Bewegungsrichtung an. Wenn irgendeiner dieser Punkte ein Stern ist, der d-Längeneinheiten vom Mittelpunkt des Nebels entfernt ist, so hat dieser Stern einen Kreisbogen beschrieben. Die scheinbare Winkelgeschwindigkeit aller dieser Sterne, ganz abgesehen von ihrer Entfernung vom Zentrum, ist die gleiche. Es scheint sich nämlich jeder Stern in 20 Zeiteinheiten um 20° gedreht zu haben. Man sieht ferner, dass die Arme nachgezogen werden.

Abbildung 3 veranschaulicht, wie die scheinbare Rotation und Entwicklungsgeschichte eines Nebels zustande kommt. Veränderlichkeit des Koeffizienten m in (2) von grossen zu kleinen Werten und der Achsen b und r des Ellipsoids in (4), das heisst allmähliche Verkleinerung von b und Vergrösserung von r von einem Urzustand, wo $b = r$ war, ergeben einen allmählichen Übergang von einer dichten, fast homogenen Kugel zu einer offenen, flachen Spirale während des Gleitens des Weltalls über aufeinanderfolgende Niveaux der Hyperspirale.

Demnach ist ein Spiralnebel eine Raumportion, die aus dem Weltall ausgeschnitten ist, durch Sektion mit einem speziellen, vierdimensionalen Gebilde. Innerhalb dieser Raumportion herrscht die Newtonsche Mechanik. Aber die gesamte Portion scheint gegen das Weltall unabhängig von ihm zu rotieren. Die Keplerschen Bewegungen in den peripheren Teilen der Nebel können verstanden werden, indem man annimmt, dass der ellipsoidale Hyperzylinder (4) nahe der Peripherie unscharf begrenzt ist oder auch dass die peripheren Sterne und Nebelmassen nicht zu dem Spiralnebel selbst gehören, sondern seine Satelliten sind.

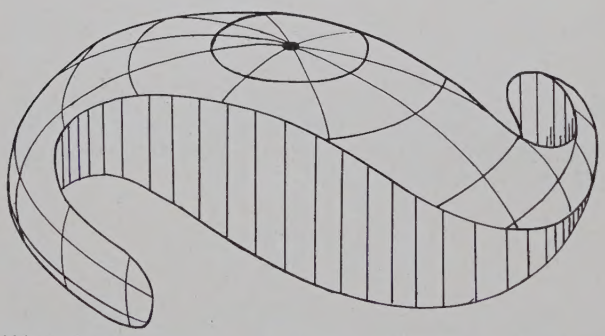


Abb. 2. Schematische Darstellung eines Querschnittes eines dreidimensionalen Raumes durch einen Hyperkörper, der um (2) aufgebaut und von (4) begrenzt ist.

Die Anerkennung des vierdimensionalen Raumes als einer geometrisch-physikalischen Realität und die hier vorgeschlagene Methode der Extrapolation verspricht weitere Anwendungen in der Kosmologie und der Physik. Nur *eine* derartige, mögliche Anwendung sei hier angeführt: Nimmt man nämlich an, dass im vierdimensionalen Raum Stoff gleichmässig verteilt ist, so ist es fast selbstverständlich, dass während der Ausdehnung der Hypersphäre «Weltall» Teile des ursprünglich «aussen» gelegenen Stoffes in das Weltall aufgenommen werden.

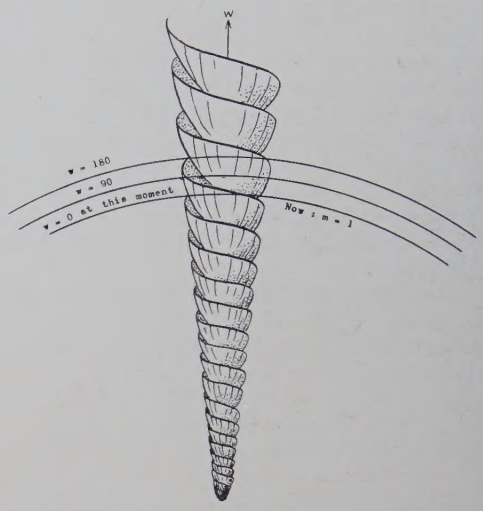


Abb. 3. Stereogramm der Direktrix des Grundraumes (2) mit veränderlichem m. m ist anfänglich (unten) gross und wird immer kleiner, so dass sich die helicoidale Direktrix für steigende Werte von w ausbreitet. Diese Figur veranschaulicht die Evolution und scheinbare Rotation der Spiralnebel. Die drei Kreisbogen stellen drei verschiedene Stellungen des sich ausdehnenden Weltalls dar.

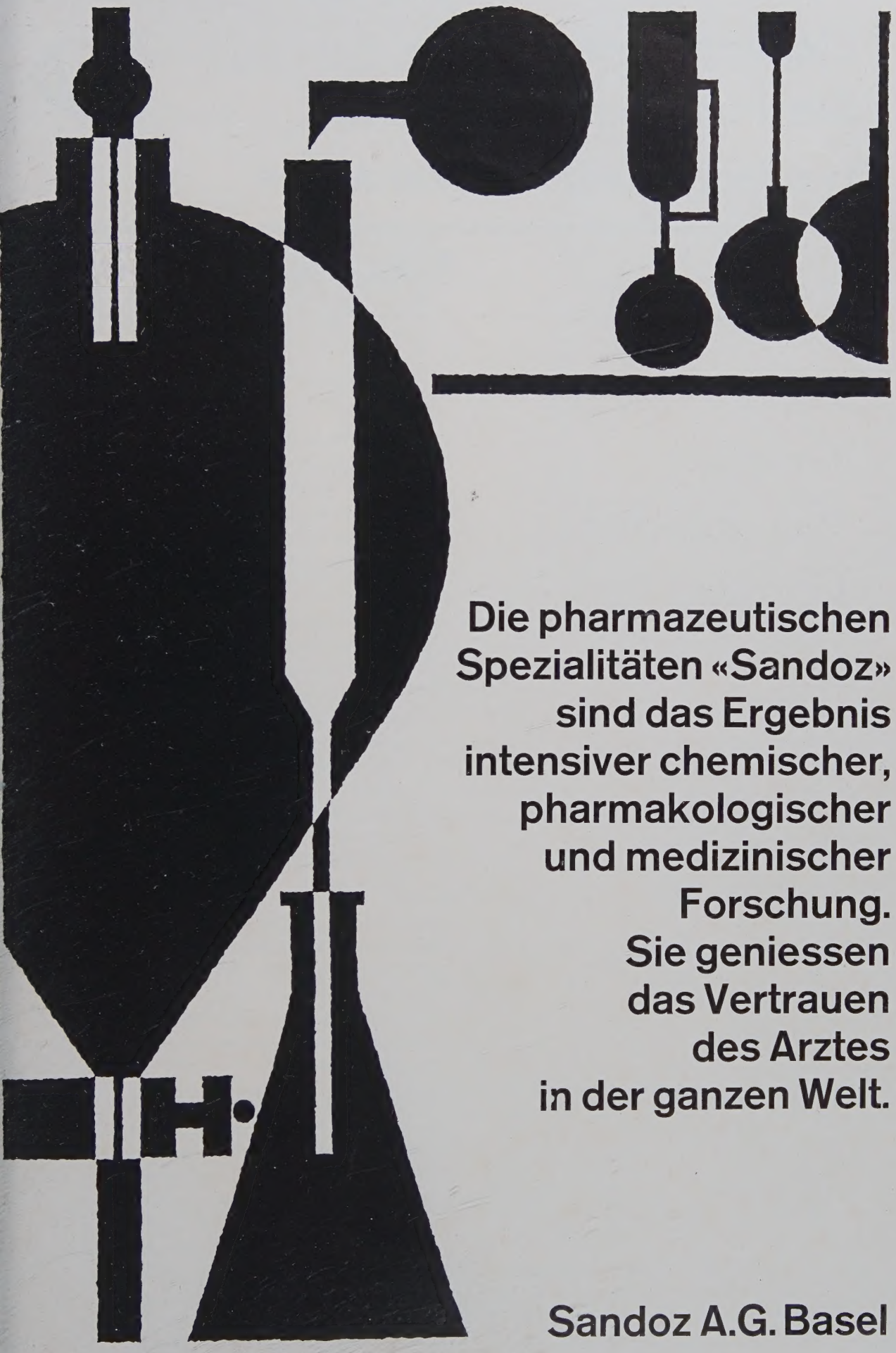
Es wird daher die unangenehm mysteriöse «continuous creation» von Hoyle, Bondi und Gold zu einem Wachstum des Weltalls durch Intussuszeption vorher vorhandenen Stoffes. Das «Verschwinden» von Stoff während einer atomischen Explosion wird zu einem Transport desselben auf die konkave Seite des Weltalls. Die dabei erzeugte Energie wird ein Beitrag zur Expansionsarbeit des Weltalls. Wir können daher wieder zu dem alten «ex nihilo nihil» zurückkehren.

H. Elias

The Chicago Medical School, Department of Anatomy, Chicago, den 29. Dezember 1955.

Summary

The expanding universe is considered to be a hypersphere immersed in a four dimensional space. An attempt is made to explain the rigid rotation of spiral and barred nebulae, not well understood on the basis of classical physics, by assuming that the geometrical solid "nebula" is a section of the universe through a four dimensional hypersolid of helicoidal curvature. Further applications of the extrapolation method to cosmology are suggested.



Die pharmazeutischen
Spezialitäten «Sandoz»
sind das Ergebnis
intensiver chemischer,
pharmakologischer
und medizinischer
Forschung.
Sie geniessen
das Vertrauen
des Arztes
in der ganzen Welt.

Sandoz A.G. Basel

Elektronenmikroskope
Elektronendiffraktographen
Hochspannungsoszillographen

Trüb, Täuber · Zürich

Die Theorie der Gruppen von endlicher Ordnung

Mit Anwendungen auf algebraische Zahlen und Gleichungen sowie auf die Kristallographie.

Von Dr. *Andreas Speiser*, em. Professor an der Universität Basel. Vierte, um einen Anhang und eine Farbtafel erweiterte Auflage. 284 Seiten mit 43 Figuren und einer Farbtafel. Preis gebunden Fr./DM 26.–, broschiert Fr./DM 23.–. Sammlung «Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften», Mathematische Reihe, Band 22.

Inhalt: Die Grundlagen – Normalteiler und Faktorgruppen – Abelsche Gruppen – Konjugierte Untergruppen – Sylow-Gruppen und p-Gruppen – Symmetrien der Ornamente – Die Kristallklassen – Permutationsgruppen – Automorphismen – Monomiale Gruppen – Darstellung der Gruppen durch lineare homogene Substitutionen – Gruppencharaktere – Anwendung der Theorie der Gruppencharaktere – Arithmetische Untersuchungen über Substitutionsgruppen – Gruppen von gegebenem Grade – Die allgemeinen linearen homogenen Substitutionen und ihre Invarianten und Kovarianten – Gleichungstheorie – Anhang – Namenverzeichnis – Sachverzeichnis.

In ihren elementaren Teilen besteht die Gruppentheorie aus vielleicht nicht immer organisch zusammenhängenden Methoden und Begriffen, und die Gliederung des Stoffes ist schon in hohem Grade festgelegt. Erst mit der Theorie der Substitutionsgruppen setzt eine weittragende und systematische Theorie ein, die im Grunde auf zahlentheoretische Betrachtung hinausläuft.

Den Anwendungen auf die Kristallographie und die in der Physik wichtig gewordene Lehre von den symmetrischen Gruppen und von den In- und Kovarianten wurde besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Im Anhang wird versucht, die gegenseitige Beziehung zwischen den Begriffen der Funktion und der Substitution, ferner zwischen der körperfesten und raumfesten Deutung der Symmetriegruppen zu klären, und eine neu hinzugefügte Figur soll zeigen, wie man die Gruppentheorie auch als heuristische Methode für die Kunst verwenden kann.

Bestellungen an Ihren Buchhändler

BIRKHÄUSER VERLAG
BASEL/STUTTGART